

## **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NO ESCURO NA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Mayara Oliveira Brandão Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jane Martha Graton Mikcha (Orientadora). E-mail: ra124479@uem.br / jmgmikcha@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Agrárias / Ciência de Alimentos.**

**Palavras-chave:** terapia fotodinâmica; tempo de escuro; fotossensibilizador.

### **RESUMO**

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica emergente no controle de microrganismos também no setor alimentício. Ela utiliza uma molécula fotoativa (fotossensibilizador – FS), luz visível e oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), que inativam os microrganismos. Uma escolha promissora para o FS é a curcumina, extraída da planta *Curcuma longa*, por suas propriedades biológicas. O objetivo foi avaliar o impacto de diferentes tempos de incubação no escuro, antes da iluminação, sobre a eficácia da TFD contra *Staphylococcus aureus*. Os ensaios utilizaram curcumina em concentrações de 20µM, 40µM e 100µM. Após a incubação no escuro (5, 10 e 30 minutos), as amostras foram iluminadas por 5 minutos com LED azul, a viabilidade bacteriana foi medida e os resultados expresso em Log<sub>10</sub> UFC/mL. Os resultados demonstraram que, nos tempos de 5 e 10 minutos de escuro não houve diferenças nas contagens bacterianas. No tempo de escuro de 30 minutos, não foram detectadas células viáveis nas três concentrações de curcumina avaliadas. A conclusão do estudo indica que, dentro dos parâmetros analisados, o tempo de incubação no escuro de 30 minutos foi possível ter uma melhora na inativação microbiana. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar outros fatores que podem impactar a eficácia desse tratamento.

### **INTRODUÇÃO**

A terapia fotodinâmica (TFD) está se popularizando no controle de microrganismo em diversas áreas, dentre elas no setor alimentício. Esse método tem como princípio reações fotoquímicas e fotofísicas, sendo necessário o uso de uma molécula fotoativa ou fotossensibilizador (FS), luz visível e oxigênio molecular, a interação entre esses três ativos gera espécies reativas de oxigênio (ERO) que inativam o

microrganismo (Bagnato et al., 2023). Para uma TFD eficaz, é necessário o uso de um FS com alta capacidade de absorção de luz e geração de ERO. A curcumina, um composto fenólico extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*, tem uso medicinal milenar na cultura chinesa e é reconhecida como segura por diversos órgãos reguladores, inclusive a ANVISA. Este composto apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, além de ter as características necessárias de um ótimo FS para TFD (Babinski et al., 2022). Nos ensaios de inativação, o FS deve entrar em contato com o microrganismo por um tempo, longe de fontes de luz para evitar o consumo da molécula ativadora, para interagir e atingir os microrganismos alvo antes da iluminação. Esse tempo de incubação pode interferir na eficácia e resultado do método (Amorim, 2022). Este estudo teve como objetivo avaliar diferentes tempos de incubação no escuro do FS, com a bactéria *Staphylococcus aureus* e assim analisar se essa variação pode efetivamente alterar os resultados antimicrobianos da TFD.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A curcumina utilizada foi a *CurcuVail* (Galena), que é um extrato de *Curcuma longa* com 35% de curcuminoides totais (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina). A curcumina foi diluída nas concentrações: 20µM, 40µM e 100µM. Utilizou-se nos experimentos a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, avaliando-se a contagem de colônias (UFC/mL). Foram realizados diferentes controles, sendo eles: controle sem luz e sem curcumina (suspensão bacteriana em solução salina 0,85%); controle de luz (suspensão bacteriana iluminada); controle do fotossensibilizador (suspensão bacteriana com curcumina a 20, 40 e 100µM). Os ensaios foram conduzidos conforme os seguintes passos: primeiro o estoque bacteriano foi reativado em caldo nutritivo *Brain Heart Infusion* (BHI) incubando por 24h a 35°C, em seguida semeado em Ágar Baird-Parker e incubado a 35°C por 48h, posteriormente 3 a 5 colônias foram transferidas para caldo BHI e incubado por 16-18h a 35°C. Após a incubação o inóculo bacteriano foi padronizado a  $10^7$  UFC/mL. Em microplacas estéreis de 96 poços, foram colocados 190µL da curcumina em diferentes concentrações (20µM, 40µM e 100µM) + 10µL de inóculo padronizado, em triplicata, incubou-as em diferentes tempos de escuro (5, 10 e 30 minutos) e, em seguida, iluminou-se as placas por 5 minutos utilizando-se de um sistema de luz diodo emissor de luz (LED), composto por 20 diodos emissores de luz (LED) azul (3W) com irradiância de 16 mW/cm<sup>2</sup> e comprimento de onda de 450nm. Após isso realizou-se a diluição seriada das amostras até obter-se a diluição  $10^{-6}$ , semeou-se em Ágar TSA e incubou-se as

placas por 24h à 35°C. Por fim, contou-se as colônias das placas e calculou-se  $\log_{10}$  UFC/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados para avaliar os controles (Tabela 1), o controle apresentou aproximadamente 7,27 UFC/mL e as contagens dos controles de luz e de curcumina mantiveram-se próximas, inferindo assim, que o FS e a luz isoladamente não interferiram no crescimento bacteriano.

Nos ensaios de TFD com diferentes tempos de escuro e concentrações de curcumina as médias em  $\log_{10}$  UFC/mL foram bem próximas umas às outras conforme a tabela 2. No tempo de escuro de 5 minutos, com curcumina a 20 $\mu$ M e 5 minutos de luz os resultados variaram entre 2,0 e 2,5  $\log_{10}$  UFC/mL, não apresentando diferença quando comparado ao tempo de escuro por 10 minutos. Na concentração de 40 $\mu$ M, os resultados dos tempos de escuro a 5 e 10 minutos obtiveram mesma média de 2,0  $\log_{10}$  UFC/mL. Com 30 minutos de tempo de escuro, o  $\log_{10}$  UFC/mL foi menor que 2,0 nas três concentrações de curcumina avaliadas, resultado promissor comparado aos outros tempos. A curcumina em concentração de 100 $\mu$ M, também obteve  $\log_{10}$  UFC/mL menor que 2,0 em todos os tempos de escuro testados.

**Tabela 1.** Viabilidade celular de *S. aureus* ( $\log_{10}$  UFC/mL) dos experimentos dos controles.

| Média em $\log_{10}$ UFC/mL      |                 |                               |                               |                                |
|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Controle sem luz e sem curcumina | Controle de luz | Controle curcumina 20 $\mu$ M | Controle curcumina 40 $\mu$ M | Controle curcumina 100 $\mu$ M |
| 7,27                             | 6,94            | 7,11                          | 7,00                          | 6,60                           |

**Tabela 2.** Média de  $\log_{10}$  UFC/mL dos ensaios de TFD variando o tempo de incubação de escuro e a concentração de curcumina.

| Média em $\log_{10}$ UFC/mL |                      |                      |                       |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Tempo de escuro             | Curcumina 20 $\mu$ M | Curcumina 40 $\mu$ M | Curcumina 100 $\mu$ M |
| 5 minutos                   | 2,0-2,5              | 2,0                  | <2,0                  |
| 10 minutos                  | 2,0-2,5              | 2,0                  | <2,0                  |
| 30 minutos                  | <2,0                 | <2,0                 | <2,0                  |

O tempo de luz foi fixado em 5 minutos em todos os ensaios.

Os resultados nos tempos de escuro 5 e 10 minutos não diferiram entre si. Contudo, quando incubado no escuro por mais tempo (30 minutos) não foram detectadas células viáveis. É importante ressaltar que as contagens de 2,0 - 2,5 Log<sub>10</sub> UFC/mL foram próximas ao limite de detecção da técnica (< 2,0 Log<sub>10</sub> UFC/mL). Toni et al., (2022) também relataram que o maior tempo de contato entre FS e microrganismo antes da luz o mais eficaz. Porém, de acordo com Contrucci et al. (2022), diversos fatores fazem parte desse efeito antimicrobiano, sendo assim a eficácia a TFD não se deve a um só parâmetro, mas a um conjunto deles.

## CONCLUSÕES

O estudo concluiu que, nos tempos de escuro analisados, o maior tempo de interação no escuro entre o FS e *S. aureus* antes da iluminação, foi o mais promissor. Apesar disso, é importante salientar que são necessários mais estudos, pois há diversos fatores que podem interferir na efetividade ou não da inativação antimicrobiana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a equipe do DAB-UEM.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, A. da S. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana - Aplicações de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Bactérias e Vírus**. Dissertação (Mestrado em Química Medicinal) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2022.

BABINSKI, T. P., et al.. Uso da curcumina na terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma revisão. **Braz. Jour. of Heal. Rev.**, Curitiba, v. 5, n. 2, 7259-7271 mar./apr., 2022.

BAGNATO, V.; REQUENA, M. **Terapia fotodinâmica dermatológica: programa Terapia Fotodinâmica Brasil**. Volume 2, Even3 publicações, 2023, São Paulo.

CONTRUCCI, B. A., *et al.* Utilização de terapia fotodinâmica e óleos essenciais no controle In Vitro de *Acinetobacter Baumannii* e *Pseudomonas Aeruginosa*. **Braz. Jour. of Heal. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 5695–5707, 2023. DOI: 10.34119/bjhrv6n2-099.

TONI A.G., *et al.* Terapia fotodinâmica com verteporfina associada à injeção intravítrea de antifator de crescimento endotelial vascular para tratamento de hemangioma circunscrito de coróide. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 81, e0030, abr. 2022.