



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA FOTOINATIVAÇÃO DE **STAPHYLOCOCCUS AUREUS MEDIADO POR DMMB-AuNPs - Análise** **microbiológica**

Amanda Ines Vieira de Mello¹; Anildo Alves de Brito Júnior²; **Juliana Monteiro**
Azevedo

1. Bolsista – PIBITI/CNPq, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amandaines.mello@gmail.com.br
2. Co-orientador, Mestre em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, e-mail: junioranildo02@gmail.com
3. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jscmonteiro@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Inativação Fotodinâmica, Nanotecnologia, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Infecções mediadas por *Staphylococcus aureus* são consideradas uma das principais causas de infecções nosocomiais na América Latina, com ameaça significativa à saúde pública. O tratamento dessas infecções apresenta limitações relacionadas, especialmente, ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, considerando a presença de barreiras biológicas e a capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes (*quorum sensing*) Vanegas (2019).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) é uma estratégia terapêutica para o controle das infecções causadas por *S. aureus*, na qual é pouco provável o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Ela é regulada pela ação de um fotossensibilizador (FS) excitado pela absorção da luz, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio que são altamente citotóxicas as células-alvo, como as bactérias Huang *et al* (2017).

Embora a literatura seja clara ao considerar a TFDa como uma terapia eficiente no controle de infecções e redução de microrganismos, existem variados protocolos da TFDa referentes ao FS (tipo, concentração ideal e período de pré-irradiação) e a fonte de luz (densidade de energia, potência, tempo de irradiação e comprimento de onda) Demidova & Hamblin (2004), que podem ser aplicados aos diferentes desafios microbianos. Ainda assim, alguns parâmetros da TFDa ainda se mostram limitados e a inserção direcionada para a nanotecnologia oferece possibilidade de superação dessas limitações potencializando os efeitos da TFDa contra bactérias patogênicas.

O uso da nanotecnologia, especialmente através da conjugação de nanopartículas de ouro (AuNPs) ao FS, pode potencializar os efeitos citotóxicos da TFDa contra *S. aureus*. A escassez de estudos envolvendo AuNPs conjugadas com o 1,9-dimetil azul de

metileno (DMMB), visando a inativação do *S. aureus*, estimulou a realização dessa pesquisa. O presente plano de trabalho teve como objetivo avaliar através de análise microbiológica, a efetividade da TFDa com uso de FS conjugado DMMB-AuNPs, em feridas potencialmente contaminadas por *S. aureus*, em dorso de ratos.

METODOLOGIA

O protocolo dessa pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) sob o nº 7290250722.

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, machos, idade média de três meses, peso entre 250 e 300g. A cepa bacteriana usada nesse experimento foi *S. aureus* ATCC 25923, que faz parte da coleção de culturas do Laboratório Labchecap (Salvador, BA, Brasil).

Vinte e quatro horas após a inoculação de *S. aureus*, foi feita uma coleta das secreções das feridas dos animais para confirmar a contaminação através da semeadura em meio Baird-Parker e contagem das UFC. Quarenta e oito horas após a inoculação de *S. aureus* Oliveira *et al.* (2003), os animais foram organizados em 08 grupos experimentais para receber tratamentos específicos: G1 Controle; G2 LED, G3 DMMB, G4 LED+DMMB G5 AuNP, G6 DMMB+AuNPs, G7 AuNPs+LED; G8 AuNPs+DMMB+LED

Para a realização da TFDa, foi utilizado como FS, o conjugado DMMB-AuNPs. Para conjugação foi utilizado o corante 1,9 dimetil azul de metileno (DMMB) (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e as nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), conforme Monteiro (2020). O tempo de pré-irradiação, que corresponde ao período necessário para que a bactéria absorva o DMMB-AuNPs, foi de cinco minutos, Monteiro *et al.* (2020). Para excitar o FS foi utilizado o LED vermelho, $\lambda 630 \pm 20 \text{nm}$, CW, potência de $125 \pm 5 \text{ mW}$, densidade de energia 12J/cm^2 (Fisioled, MMOptics, São Carlos, SP) para cálculo em uma área média de incidência de $0,785 \text{cm}^2$ e tempo de 192 segundos.

Imediatamente após os tratamentos experimentais, as amostras foram coletadas para a análise microbiológica, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e cálculo do log de UFC/mL ($\text{Log}_{10} \text{UFC/mL}$). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os valores foram expressos como média log 10 e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad® Prism 8.1 (San Diego-CA, USA). Foi utilizado o teste ANOVA unidirecional e teste de Tukey múltiplas comparações. Para as análises foram considerados como estatisticamente significante o $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos grupos homogêneos, sem diferença, e os dados resultantes em todas as condições experimentais podem ser visualizados na Figura 1.

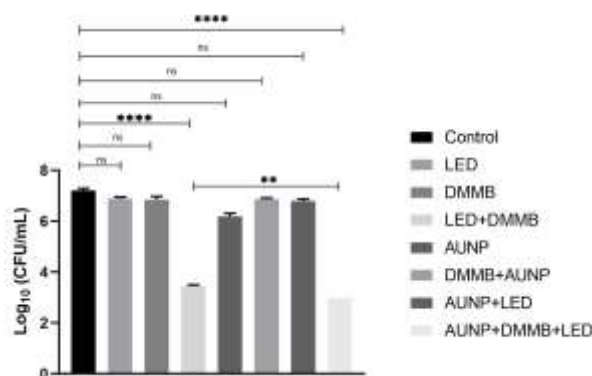


Figura 1: Representação gráfica das análises estatísticas ANOVA e Tukey, entre os grupos controle, LED, DMMB, LED+DMMB, AuNP, DMMB+AuNP, AuNP+LED e AuNPs + DMMB + LED. Ns (insignificante), ** $p=0.0014$, **** $p<0.0001$.

Esse estudo avaliou, *in vivo*, a efetividade da TFDa em feridas potencialmente contaminadas por *S. aureus*, através do percentual de redução microbiana por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Dos 08 grupos experimentais, exclusivamente os grupos de TFD, (AuNPs+DMMB+LED e LED+DMMB) foram capazes de demonstrar efeito bactericida significativo contra *S. aureus*, promovendo reduções de 99,9993% ($p<0.0001$) e 99,994% ($p<0.0001$), respectivamente. Quando comparamos esses dois grupos, foi identificada uma diferença com significância estatística entre eles ($p=0.0014$), demonstrado que a incorporação da nanotecnologia na TFDa, através do uso de nanopartículas de ouro, potencializa a morte celular de *S. aureus*. Destaca-se ainda que o uso da nanotecnologia em nossa análise *in vivo* foi capaz de demonstrar um efeito bactericida com redução de 4 log UFC/mL em relação ao grupo Controle.

Achados semelhantes foram também obtidos no estudo *in vitro* de Monteiro *et al.* (2020) e ressaltam o potencial do DMMB como um corante fotoativável, capaz de produzir cataliticamente espécies oxidantes e levar a morte microbiana. Quando conjugado a AuNPs, observou-se uma potencialização significativa da ação antimicrobiana, sugerindo que as AuNPs são nanocarreadores promissores e agentes de entrega de corantes. Quanto à comparação com os resultados alcançados nos estudos *in vivo* e *in vitro*, obtivemos uma taxa de redução microbiana para os grupos AuNPs+DMMB+LED (99,9993%) e LED+DMMB (99,994%) superior ao observado na análise *in vitro* de Monteiro *et al.* (2020), AuNPs+DMMB+LED (99,994%) e LED+DMMB (99,96%). Esse aumento percentual na redução microbiana pode ser justificado pelo modelo experimental *in vivo*, na qual devemos considerar a complexidade do sistema biológico, e uma atuação do sistema imunológico do hospedeiro sobre o microrganismo inoculado, Madigan *et al.* (2009).

Semelhantemente ao presente trabalho, Darabpour *et al.* (2017) empregou o MB como FS associado a AuNPs fotoativado com um laser de diodo 650 nm, os resultados demonstraram a inativação *in vitro* de *S. aureus* com redução significativa da carga microbiana (redução > 5 log UFC). Outro estudo avaliou *in vitro* os efeitos da TFDa utilizando o MB, conjugado com nanocascas de ouro com espessura de 21,5 nm, contra às cepas de *C. albicans* e *S. aureus*. Em relação ao *S. aureus*, a conjugação do FS a

nanocascas de ouro reduziu em 3x o tempo de iluminação da TFDa, para erradicação total das células bacterianas, Correia (2018).

A proposta terapêutica do presente estudo demonstrou resultados promissores, com potencial de aplicação em estudos clínicos e serviços de saúde. É necessário ressaltar que o protocolo utilizado nesse estudo foi baseado em uma única aplicação, sendo possível sua repetição objetivando resultados ainda melhores, uma vez que a TFDa não é capaz de causar resistência microbiana.

CONCLUSÃO

O uso da nanotecnologia (AuNPs) associada a um fotossensibilizador fenotiazínico (DMMB), nos parâmetros da fonte de luz LED empregada, potencializou a TFDa, sendo considerada um tratamento promissor frente à cepa de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12. ed.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. 2004. Photodynamic therapy targeted to pathogens. INT J IMMUNOPATH PH, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 245-254. SAGE Publications.

HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIN, M. R. 2012. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. LASER SURG MED, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 490-499. Wiley.

DARABPOUR, E.; KASHEF, N.; AMINI, S. M.; KHARRAZI, S.; DJAVID, G. E. 2017. Fast and effective photodynamic inactivation of 4-day-old biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using methylene blue-conjugated gold nanoparticles. J DRUG DELIV SCI TEC, [S. l.], v. 37, p. 134-140. Elsevier BV.

CORREIA, T. T. S. 2018. Inativação fotodinâmica antimicrobiana in vitro de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* assistida por nanocascas de ouro. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

VANEGAS, J. F. B. 2019. Planejamento racional e síntese de peptidomiméticos macrocíclicos para a inibição de Quorum Sensing em *Staphylococcus aureus*. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília.

MONTEIRO, J. S. C.; RANGEL, E. E.; OLIVEIRA, S. C. P. S. DE; CRUGEIRA, P. J. L.; NUNES, I. P. F.; FAGNANI, S. R. C. DE A.; SAMPAIO, F. J. P.; ALMEIDA, P. F. DE; PINHEIRO, A. L. B. 2020. Enhancement of photodynamic inactivation of planktonic cultures of *Staphylococcus aureus* by DMMB-AuNPs. PHOTODIAGN PHOTODYN, [S. l.], v. 31, p. 101930. Elsevier BV.