

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO EXTRATODE *BIDENS SULPHUREA* E *TAGETES RERECTA***

RENATA OLIVEIRA SANTOS<sup>1</sup>, CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, HENRIQUE DANTAS DE MENEZES<sup>3</sup>

**RESUMO**

Microorganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus podem ser mortos por luz visível depois de tratamento com um fotossensibilizador apropriado, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”). Neste trabalho avaliamos a eficiência PDI *in vitro* de *Escherichia coli* utilizando Azul de metileno, fotossensibilizador amplamente estudado na comunidade científica, e também os extratos bruto de *Bidens sulphurea* (variações laranja e amarela) e de *Tagetes erecta* como fotossensibilizador. A emissão de luz foi efetuada por LEDs (Light Emissor Diodes) em um comprimento de onda de aproximadamente 640 nm, ativando o fotossensibilizador e com isso produzindo oxigênio singlete. O extrato bruto de *Bidens sulphurea* (variação laranja) e o Azul de metileno foram eficientes na inativação fotodinâmica desta bactéria, mas o extrato de *Tagetes erecta* e a variação amarela de *Bidens sulphurea* não apresentaram atividade fotodinâmica.

**PALAVRAS CHAVE:** Inativação fotodinâmica, microorganismos não patogênicos, *Asteraceae*

**ABSTRACT**

Microorganisms as bacteria, fungi, yeasts and viruses can be dead by visible light after treatment with an appropriate photosensitizer, in a process called Photodynamic Inactivation (PDI). In this work we evaluated the PDI efficiency *in vitro* of *Escherichia coli* using Methylene blue, a widely studied photosensitizer in the scientific community, and also the crude extracts of *Bidens sulphurea* (orange and yellow variations) and *Tagetes erecta* as photosensitizers. The light emission was effected by LEDs (Light Emissor Diodes) in a wavelength of approximately 640 nm, activating the photosensitizer and with this producing singlet oxygen. The crude extract of *Bidens sulphurea* (orange variation) and the Methylene blue have been efficient in the photodynamic inactivation of this bacterium, but the extract of *Tagetes erecta* and the yellow variation of *Bidens sulphurea* haven't presented photodynamic activity.

**KEY WORDS:** Photodynamic inactivation, not pathogenic microorganisms, *Asteraceae*

---

Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, 2121 Uberlândia-MG, CEP: 38400-902.

1- renata\_oliveirasantos@hotmail.com ; 2- oliveira@ufu.br ; 3- henriquedmenezes@gmail.com ;

## INTRODUÇÃO

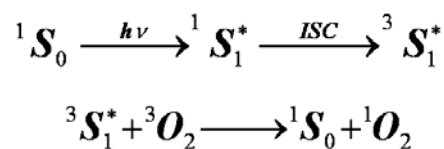
Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos no mundo todo<sup>1</sup>, o que, segundo Hamblin e Hasan<sup>2</sup>, pode levar ao fim de um extenso período chamado de “era do antibiótico”.

Desta forma, novos procedimentos de intervenção devem ser desenvolvidos no sentido de promover inviabilização do crescimento microbiano, e que não tenha associação com mecanismos de resistência microbiana comumente observados com antibióticos. A Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”) de microorganismos é uma área de pesquisa em expansão e envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador, oxigênio molecular e luz de comprimento de onda adequado. Durante o evento fotodinâmico, são produzidas espécies reativas do oxigênio (EROs) que inviabilizam moléculas biológicas presentes ao redor, promovendo efeitos bacteriostáticos e bactericidas.

A PDI, sendo efetiva contra vírus, bactérias e fungos, pode ser usada como uma terapia para infecções localizadas. Em contraste com a Terapia Fotodinâmica (TFD) de câncer, onde o fotossensibilizador

usualmente é injetado na corrente sanguínea e se acumula no tumor, a PDI pode ser feita por aplicação local do fotossensibilizador na área infectada por aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou aerosol<sup>2</sup>.

A TFD é baseada na utilização de moléculas sensíveis à luz. Estas moléculas são chamadas de fotossensibilizadores, e quando ativadas por luz de comprimento de onda adequado, produzem várias espécies ativas do oxigênio, sendo a principal, o oxigênio singlete (**figura 1**). A formação desta e de outras espécies ativas na membrana celular e na membrana de organelas, resulta em inviabilização e morte celular<sup>3</sup>.



**Figura 1:** Reação entre um sensibilizador e o oxigênio molecular, formando o oxigênio singlete. Fonte (Machado, 2003)<sup>4</sup>

A família *Asteraceae*, a maior do grupo das Angiospermas tem grande importância econômica, pois inclui espécies que são utilizadas como ornamentais, na alimentação e como medicinais. Devido ao seu extraordinário poder de adaptação ambiental, podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em diferentes regiões

climáticas (tropicais, subtropicais e temperadas). Outro fator importante para seu sucesso biológico é sua grande capacidade de dispersão, devido à presença de pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e metabólitos secundários.<sup>5</sup>

As plantas desta família produzem compostos orgânicos que possuem inúmeras atividades biológicas, tais como atividade antiinflamatória, imunossupressiva, antitumoral, bactericida, etc.<sup>6</sup>

As **figuras 2 e 3** representam as duas espécies de plantas da família *Asteraceae* estudadas em nosso trabalho.



**Figura 2:** *Bidens sulphurea* ([http://farm4.static.flickr.com/3264/2815453125\\_b8be10f667.jpg?v=0](http://farm4.static.flickr.com/3264/2815453125_b8be10f667.jpg?v=0))<sup>7</sup>

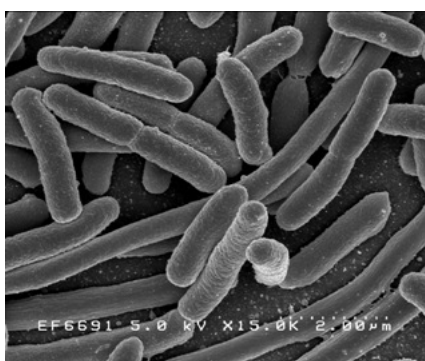


**Figura 3:** *Tagetes erecta* ([http://www.jardineiro.net/br/banco/tagetes\\_erecta.php](http://www.jardineiro.net/br/banco/tagetes_erecta.php))<sup>8</sup>

É conhecido que bactérias gram-positivas são geralmente mais susceptíveis à PDI quando comparado com bactérias gram-negativas. Esta diferença é atribuída à diferenças estruturais na parede celular. Bactérias gram-negativas têm uma estrutura complexa da membrana externa formada por duas bicamadas lipídicas enquanto gram-positivas possuem uma única bicamada e uma camada externa relativamente permeável.<sup>9</sup>

A *Escherichia coli* (**figura 4**) além de ser uma bactéria de fácil obtenção e manuseio, foi escolhida para ser alvo de nosso trabalho uma vez que nos interessa principalmente sua membrana celular, caso ocorra inibição fotodinâmica desta bactéria Gram-negativa, supõe-se que também ocorrerá inativação das bactérias Gram-positivas. Esta bactéria é um dos microrganismos tido como habitante natural

da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo, portanto, normalmente encontrado nas fezes destes animais. É uma bactéria Gram-negativa que assume a forma de um bacilo e pertence à família das *Enterobacteriaceae*, muitas de suas cepas não são patogênicas.<sup>10</sup>



**Figura 4:** *Escherichia coli* vista através de microscópio eletrônico. ([http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/images/e\\_coli.jpg](http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/images/e_coli.jpg))<sup>11</sup>

A extensão da morte celular microbiana é dependente da concentração empregada do fotossensibilizador e do tempo de irradiação.

Estes resultados enfatizam o uso da fotoinativação como um procedimento alternativo aos antimicrobianos tradicionais, permitindo uma eliminação do microorganismo de regiões de pele infectadas ou de locais do corpo que possam

veicular e disseminar estes microorganismos resistentes à antibioticoterapia.

A vantagem da fotoinativação de microorganismos é que o efeito bactericida é rápido, altamente localizado, não interferindo com a microflora de outros sítios corpóreos. Como o evento citotóxico é dependente da produção de oxigênio singlete e radicais livres, o desenvolvimento de resistência ao procedimento é bem pouco provável.<sup>2</sup>

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fotodinâmico de extratos de plantas da família *Asteraceae* em comparação com o Azul de metileno, fotossensibilizador amplamente estudado pela comunidade científica, desta forma avaliamos a inativação de *Escherichia coli* após tratamento com o extrato em análise e luz em um comprimento de onda de aproximadamente 640 nm. A escolha deste comprimento de onda deve-se ao fato do intervalo do espectro eletromagnético mais significativo está na região entre 600 e 800 nm, onde a membrana celular apresenta baixa absorvidade. Nesta região é possível magnitudes na penetração da luz próximas a 3 centímetros em tecidos dotados de baixa pigmentação. Deste modo é possível evitar destruições desnecessárias causada às

demais organelas presentes no meio que não possuem a droga sensitizadora.

O aparelho de LEDs tem a vantagem frente às demais fontes de irradiação de não fornecer calor para o sistema, e portanto não sendo o causador da inativação das bactérias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

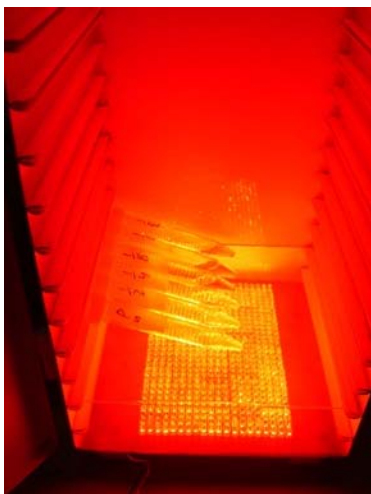
Os extratos etanólicos de *Bidens sulphurea* (variações laranja e amarela) e de *Tagetes erecta* foram preparados dissolvendo-se 30,000g das pétalas trituradas das plantas em 250 mL de etanol 92,8° GL, permanecendo em recipiente fechado por aproximadamente 2 horas, após este período filtrou-se as soluções.

Tanto os extratos das plantas quanto o Azul de metileno, foram testados através da técnica de diluição em tubo, esta técnica proporciona resultados mais rápidos e adequados quando um grande número de amostras está sendo testado.<sup>12</sup>

Diluições seriadas da substância-teste foram feitas restando em cada tubo 0,5mL da solução diluída, sendo analisadas, portanto, as seguintes diluições: substância pura,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$  e  $\frac{1}{32}$ . Adicionou-se a cada uma das diluições 0,5mL de suspensão de *Escherichia coli*, cultivada em

Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB), com turvação de aproximadamente 1 na escala de Mac Farland. O mesmo procedimento foi realizado na presença e na ausência de irradiação luminosa, para que se pudesse ter certeza do potencial fotodinâmico da substância e não apenas de sua citotoxicidade. Testes preliminares foram feitos utilizando apenas etanol, não havendo inibição bacteriana nestas condições. A emissão de luz foi efetuada por LEDs (Light Emissor Diodes) em um comprimento de onda de aproximadamente 640nm durante 15 minutos (**figura 5**). Após este período adicionou-se 1mL de Caldo Fluorocult (LMX), neste meio, após 24 horas em estufa a 37°C, foi possível observar se houve inativação do microorganismo devido à diferença de cor entre os meios onde ocorreu crescimento da bactéria, caracterizado por uma cor azul que apresenta forte fluorescência, e onde não houve crescimento da bactéria, caracterizado por uma cor amarela, não-fluorescente. Para confirmar esta inativação, foram transferidos 10µL destas suspensões para uma placa de Petri com o ágar PCA, espalhado com movimentos circulares (“pourplate”), para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Escherichia coli*. Essas placas foram

colocadas na estufa por mais 24 horas a 37°C para o crescimento das colônias dos microorganismos que sobreviveram ao efeito fotodinâmico.



**Figura 5:** Sistema de irradiação com LEDs no comprimento de onda de aproximadamente 640 nm

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios com Azul de metileno sem a irradiação de luz houve um crescimento bacteriano a partir do tubo cuja diluição foi de  $\frac{1}{8}$  e assim sucessivamente nas amostras mais diluídas, já no ensaio cujos tubos foram irradiados com luz o crescimento bacteriano ocorreu apenas no tubo cuja diluição era de  $\frac{1}{32}$ .

Nos ensaios com *Bidens sulphurea* variação amarela o crescimento bacteriano

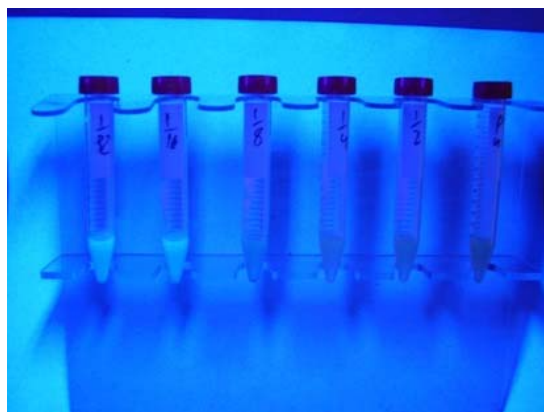
ocorreu a partir da diluição  $\frac{1}{8}$  em ambos os testes, com irradiação luminosa e sem a presença da mesma.

Nos experimentos com *Tagetes erecta* houve crescimento de *Escherichia coli* a partir da diluição  $\frac{1}{4}$ , também em ambas as condições de luz.

Como os extratos de *Tagetes erecta* e a variação amarela de *Bidens sulphurea* não apresentaram diferenças de inibição do crescimento de *Escherichia coli* com e sem a irradiação luminosa, pode-se concluir que estas substâncias não têm atividade fotodinâmica, não sendo, portanto possíveis fotossensibilizadores.

Já os testes com a variação laranja de *Bidens sulphurea* apresentaram bons resultados em relação a atividade fotodinâmica deste composto. Nestes testes, na presença de luz houve crescimento de *Escherichia coli* a partir da diluição  $\frac{1}{16}$ , enquanto no escuro, sem irradiação de luz vermelha, houve inativação até a concentração de  $\frac{1}{4}$  do extrato bruto de *Bidens sulphurea*, não sendo observado crescimento da bactéria em ambos os sistemas, tubos com LMX e nas placas de Petri. A partir da concentração 1/8 houve crescimento bacteriano. Nesta concentração,

apesar de não ter apresentado fluorescência (**figura 6**), foram observadas aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  UFC/mL na placa de Petri com PCA.



**Figura 6:** Tubos de ensaio após procedimento, em presença de luz UV.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que o extrato bruto de *Bidens sulphurea* (variação laranja) foi eficiente na inativação de *Escherichia coli* apenas na presença de luz, revelando o potencial fotoinativante dos compostos presentes nesta planta. Já os extratos da variação amarela desta mesma planta e de *Tagetes erecta* não apresentaram discrepâncias das inibições bacteriana na presença e na ausência de luz, não

possuindo, portanto, características de fotossensibilizadores.

O foco de nosso trabalho foi na verificação da presença de fotossensibilizadores nas plantas estudadas. Assim, caso a presença dos mesmos seja identificada haverá uma posterior caracterização dos componentes químicos destas plantas.

Ainda é necessário ainda confirmar a atividade fotodinâmica de *Bidens sulphurea* (variação laranja) através de outros modelos celulares, tais como bactérias Gram-positivas, fungos, leveduras e microcrustáceos, além de diferentes metodologias, sendo este o próximo passo do nosso trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UFU) pelo auxílio financeiro concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.-M.; LEHN, N.; ABELS, C.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 1542.

2 - HAMBLIN, M. R.; HASAN, T.;  
*Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3, 436.

3 - HAMBLIM, R.M; NEWMAN,  
E.L.; *J. Photochem.Photobiol.*, 13, 3 (1994).

4 - MACHADO, A.E.H.; *Química  
Nova*, 23: 237 (2000).

5 - VENABLE, D.L.; LEVIN, D.A.  
1983. Morphological dispersal structures in  
relation to growth habit in the Compositae.  
*Plant Systematic Evolution*, 143:1-16.

6 - CHANG et al. *Journal of  
Ethnopharmacology* 2007 112 232–236.

7 – *Bidens sulphurea*. Disponível em:  
[http://farm4.static.flickr.com/3264/28154531  
25\\_b8be10f667.jpg?v=0](http://farm4.static.flickr.com/3264/2815453125_b8be10f667.jpg?v=0) ; Acesso em  
07/01/2009.

8 – *Tagetes erecta* . Disponível em:  
[http://www.jardineiro.net/br/banco/tagetes\\_e  
recta.php](http://www.jardineiro.net/br/banco/tagetes_e<br/>recta.php) ; Acesso em :07/01/2009.

9 - DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN,  
M. R.; *Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy*. 2005, vol 49(6): 2329-2335.

10 - *Escherichia coli*. Disponível em:  
[http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)  
Acesso em: 06/01/2009.

11 – University of California.  
Disponível em:  
[http://www.universityofcalifornia.edu/every  
day/agriculture/images/e\\_coli.jpg](http://www.universityofcalifornia.edu/every<br/>day/agriculture/images/e_coli.jpg) ; Acesso  
em 07/01/2009.

12 – PELCZAR Jr., J.M.; CHAN, E.  
C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia:  
conceitos e aplicações*. São Paulo:  
MAKRON Books, 1996. 517 p. volume II.