

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO DE *BIDENS SULPHUREA*

RENATA OLIVEIRA SANTOS¹, LUCAS FERREIRA DE PAULA, HENRIQUE DANTAS DE MENEZES, CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA

RESUMO

Os microorganismos são os seres vivos mais numerosos de nosso planeta e frequentemente estão associados à problemas de saúde humana, animal e à problemas de ordem econômica, quando afetam a agricultura e a produção de produtos de origem animal. A era dos antibióticos está prestes a entrar em colapso, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, o que propicia o constante aparecimento de microorganismos resistentes. Desta forma, novos procedimentos de intervenção devem ser desenvolvidos no sentido de promover inviabilização do crescimento microbiano. 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. Como o mecanismo de ação dos fotossensibilizadores é diferente dos exercidos pelos antibióticos, espera-se que este procedimento seja de uso mais generalizado, atuando contra diferentes tipos de membranas externas e sem aparecimento de microorganismos resistentes. Neste trabalho avaliamos a eficiência PDI in vitro de *Staphylococcus epidermidis* utilizando o extrato bruto de *Bidens sulphurea* como fotossensibilizador. A emissão de luz foi efetuada por um equipamento emissor de radiação policromática oriunda de uma lâmpada halógena denominado PHLS “Polichromatic Halogen Lamp System”, ativando o fotossensibilizador e com isso produzindo oxigênio singlete. O extrato bruto de *Bidens sulphurea* foi eficiente na inativação fotodinâmica desta bactéria, demonstrando um grande efeito citotóxico frente a mesma.

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

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

1- renata_oliveirasantos@hotmail.com ;

ABSTRACT

The microorganisms are the most numerous living system of our planet and frequently they are associated to the problems of human health, animal and to problems of economical order, when they affect the agriculture and the production of animal origin products. The age of antibiotics is ready entering in collapse, due to the indiscriminate use of antibiotics, which favors the constant appearance of resistant microorganisms. In this way, new proceedings of intervention must be developed in the sense of promoting inviabilization of the microbial growth. The Photodynamic Inactivation of microorganisms is an area of research in expansion and involves the synergic combination of a photosensitizer, molecular oxygen and light of appropriate wavelength. As the mechanism of photosensitizer action is different from the practiced ones for the antibiotics, it is waited that this proceeding is of more generalized use, acting against different types of extern membranes and without appearance of resistant microorganisms. In this work we evaluated the PDI efficiency in vitro of *Staphylococcus epidermidis* using the *Bidens sulphurea* crude extract as photosensitizer. The light emission was effected by an equipment issuer polychromatic radiation come from a halogen lamp denominated PHLS "Polychromatic Halogen Lamp System", activating the photosensitizer and with this producing singlet oxygen. The *Bidens sulphurea* crude extract has been efficient in the photodynamic inactivation of this bacterium, demonstrating a great citotoxic effect in front of them.

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

1. INTRODUÇÃO

Microorganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus podem ser mortos por luz visível depois de tratamento com fotossensibilizador apropriado e luz, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”) ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (“PACT, Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy”).

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, o que, segundo Hamblin e Hasan, pode levar ao fim de um extenso período chamado de “era do antibiótico”(Maisch et al., 2005 e Hamblin et al., 2004).

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 utilização de corantes (“sensibilizadores”) como “ferramentas” para eliminação de microorganismos indesejáveis é bastante antiga, datando do século passado, mas que ficaram um pouco de lado, devido o advento da antibioticoterapia (Von Tappeiner, 1904).

Colorantes (corantes e pigmentos) se caracterizam pela sua habilidade de absorver luz visível. Nos últimos 130 anos, cerca de 10.000 desses compostos químicos coloridos vem sendo produzidos em escala industrial. Com respeito ao número e volume de produção dos corantes e pigmentos correntemente comercializados, os compostos azo são de longe, o maior grupo de corantes. Isso se deve à simplicidade de sua síntese, ao geralmente alto coeficiente de extinção molar, e sua considerável durabilidade (Bertoloni et al., 1990)

Benefícios tanto quanto reações adversas da luz solar tem sido conhecidos por muitos séculos. Luzes têm sempre sido usadas com propósitos terapêuticos. A princípio, apenas radiação ultravioleta era aplicada com fins terapêuticos em tratamentos de peles tuberculosas e debilitada (Bertoloni et al., 1990).

Quando surgiram notificações sobre as propriedades da luz e da fluorescência de vários corantes, tornou-se claro que corantes excitados por aplicação de luz teriam efeitos destrutivos em sistemas biológicos (Bertoloni et al., 1992).

Em função do fato de absorverem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de certas reações fotoquímicas específicas. No entanto, só algumas classes de corantes e pigmentos têm sido submetidas a um estudo fotoquímico sistemático, visando conhecer com detalhes suas propriedades (Ackroyd et al., 2001).

Recentemente tem se utilizado sensibilizadores, na chamada Terapia Fotodinâmica (TFD), para a eliminação de agentes microbianos no tratamento de infecções localizadas em áreas acessíveis à luz (Maisch et al., 2005).

A PDI 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 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 (Hamblin e Newman, 1994).

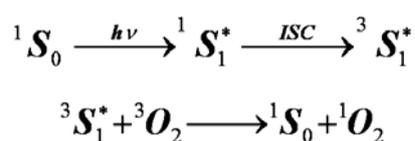


Figura 1: Reação entre um sensibilizador e o oxigênio molecular, formando o oxigênio singlete.

Fonte (Machado, 2000)

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 (Venable e Levin, 1983).

As plantas desta família produzem compostos orgânicos que possuem inúmeras atividades biológicas, tais como atividade antiinflamatória, imunossupressiva, antitumoral, bactericida, etc (Chang et al., 2007).

O gênero *Bidens* consta de cerca de 200 espécies de plantas herbáceas e sub-arbustivas, anuais ou perenes, que ocorrem no mundo inteiro. A espécie *Bidens sulphurea* (figura 2), estudada em nosso trabalho, é uma herbácea anual, ereta, muito ramificada, intensamente disseminada e naturalizada no território brasileiro. Popularmente é conhecida como cósmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, sendo considerada uma planta invasora (Lorenzi e Souza, 2001).



Figura 2: *Bidens sulphurea*

(http://farm4.static.flickr.com/3264/2815453125_b8be10f667.jpg?v=0 Acesso em 07/01/2009)

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, fungos são ainda mais resistentes à PDI devido a presença de uma membrana nuclear que pode representar uma barreira adicional à penetração do fotossensibilizador (Deminova e Hamblin, 2005).

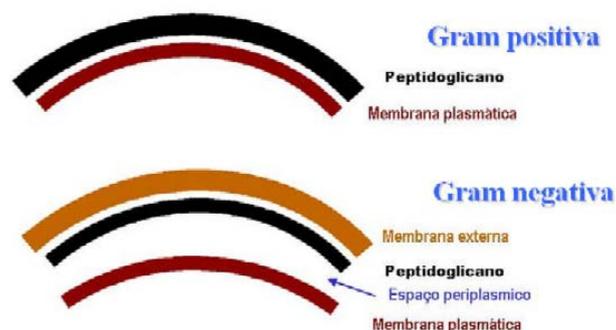


Figura 3: Diferenças entre as membranas celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (<http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/bact-mem-port.jpg> Acesso em 29/07/2009)

O *Staphylococcus epidermidis* (Figura 4) é o habitante normal da pele e mucosas, sendo considerado a espécie de estafilococos coagulase negativos de maior prevalência e persistência na pele humana, tendo um baixo potencial patogênico.

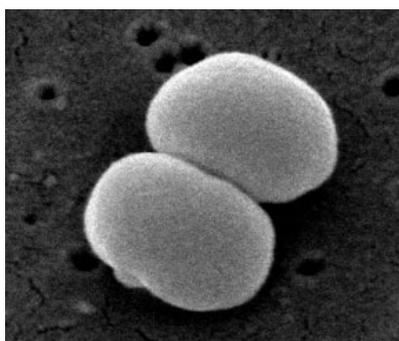


Figura 4: *Staphylococcus epidermidis*.

(<http://www.sciencemuseum.org.uk/antenna/implantinflection/> Acesso em 27/07/2009)

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 (Hamblin et al., 2004).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamento PHLs

A montagem do sistema de irradiação desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa foi feita da seguinte forma: uma lâmpada halógena utilizada em retroprojetores (marca OSRAM, modelo ENH, potência de 250W) foi acoplada à uma caixa metálica proveniente de uma fonte de computador. Nessa estrutura foi inserido um cooler de fonte de alimentação de computadores. Uma lupa de leitura de vidro cristal 100% (marca DFV, modelo LL-P100, com 100 mm de diâmetro, 175 mm de foco, armação plástica, aumento de 1,5 vezes) foi fixada à uma distância de 7 cm da lâmpada.

Em uma distância de 22,5 cm, colocou-se uma cuba de vidro oca de formato retangular, com 5 cm de percurso. Nas extremidades laterais da cuba, foi soldado um bocal permitindo a fixação de mangueiras para circulação de água em seu interior. Essa cuba permite a passagem de fluxo de água visando a refrigeração da região próxima à amostra.

A montagem completa é exibida na Figura 5. O cooler é alimentado por um transformador comum 12 V, enquanto a lâmpada é ligada diretamente na tensão alternada. (Paula et al, 2010)

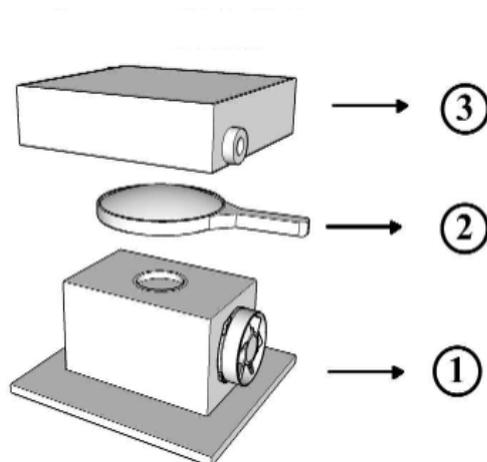


Figura 5: Equipamento PHLs, 1 – Carcaça metálica com a lâmpada e cooler acoplados, 2 – Lente de aumento, 3 – Cuba de vidro.

2.2. Extrato bruto de *Bidens sulphurea*

A atividade fotodinâmica do extrato bruto de *Bidens sulphurea* foi testada através da técnica de diluição em tubo, esta técnica é amplamente usada pela comunidade científica e proporciona resultados mais rápidos e adequados quando um grande número de amostras está sendo testado (Pelczar Jr., Chan e Krieg, 1996).

Diluições seriadas da substância-teste foram feitas, tendo-se analisado as seguintes diluições: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ e $\frac{1}{32}$, sendo descartada a realização do teste com o extrato puro, uma vez que a morte celular seria causada pela alta concentração alcoólica (estudos prévios mostraram que acima de 50% de concentração alcoólica há efeito bactericida) do mesmo e não pelos componentes da planta.

2.3. Suspensão bacteriana de *Staphylococcus epidermidis*

Retirou-se uma pequena quantidade de *Staphylococcus epidermidis* cultivado em ágar Cistina-Lactose-Eletrolito-Deficiente – CLED (Oxoid) para preparação da suspensão bacteriana em soro fisiológico estéril com turvação de aproximadamente 0,4 na escala de Mac Farland.

2.4. Incubação e irradiação

Foram incubados, no escuro, por 20 minutos 100µL de suspensão bacteriana e 100µL da diluição de *Bidens sulphurea*. Testes preliminares demonstraram que este tempo de incubação é o de melhor eficiência para a realização de nosso trabalho. Esse ensaio se repetiu para cada uma das concentrações de *Bidens sulphurea* preparadas: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ e $\frac{1}{32}$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo descartado o valor mais discrepante e tendo sido feita a média aritmética dos demais valores.

Após o período de incubação, as amostras foram irradiadas, por 20 minutos, pelo equipamento emissor de radiação policromática oriunda de uma lâmpada halógena (PHLS) (figura 5), sem agitação, e subsequentemente transferiu-se 100µL da suspensão para uma placa de petri contendo o meio de cultura fundido e mantido em estufa à 35 °C. O meio de cultura utilizado para crescimento de *Staphylococcus epidermidis* foi preparado na composição: 1,25% de extrato de carne 'lab lemco' (Oxoid), 0,50% de triptona (Oxoid), 1,00% de peptona (Biobrás), 0,50% de cloreto de sódio (Vetec, 99%), 0,25% de fosfato dissódico heptahidratado (Cinética química, 99%) e 2,00% de D-glucose (Synth, 99,9%) e 2% de ágar. Realizou-se a contagem de colônias, após 24 horas de incubação, através de um contador de colônias PHOENIX (CP 602).

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.

O plaqueamento também foi realizado para a solução salina estéril, a fim de se confirmar que não houve contaminação da mesma, e para a suspensão bacteriana. Ambos serviram de controles para o experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de absorção (Figura 7) do extrato de *Bidens sulphurea* em diferentes solventes nos mostra que o pico máximo de absorção varia de acordo com o solvente empregado.

O pico de absorção máxima em etanol é de aproximadamente 385 nm, este comprimento de onda é característico de luz ultravioleta. Portanto os resultados obtidos poderiam ter sido melhores caso tivéssemos disponível uma fonte de irradiação cuja emissão fosse na região do ultravioleta. Porém como o extrato de *Bidens sulphurea* tem uma leve absorção na região da luz visível os resultados ainda foram satisfatórios.

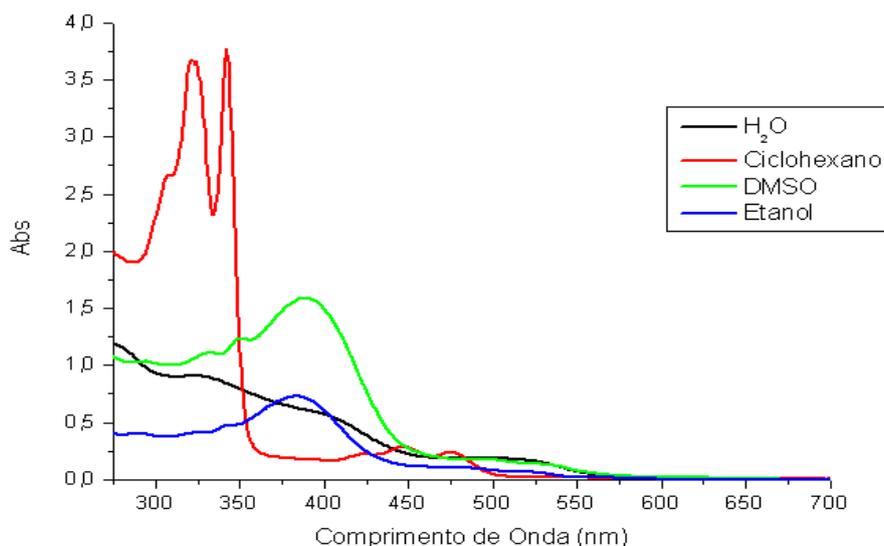


Figura 7: Espectro de absorção do extrato de *Bidens sulphurea* em diferentes solventes

Nos ensaios com *Staphylococcus epidermidis* para as diluições $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ e $\frac{1}{32}$ de *Bidens sulphurea* obtivemos respectivamente a média de Unidades Formadoras de colônias por mililitros (UFCs/mL), com irradiação de luz $5,30 \times 10^3$, $7,16 \times 10^3$, $6,88 \times 10^3$, $6,36 \times 10^3$, $6,58 \times 10^3$ e sem a irradiação de luz obtivemos respectivamente $6,10 \times 10^3$, $6,50 \times 10^3$, $7,57 \times 10^3$, $8,41 \times 10^3$ e $8,58 \times 10^3$ UFCs/mL. Não houve crescimento bacteriano na placa com solução salina estéril. Já o plaqueamento da suspensão bacteriana (controle sem o extrato) resultou em uma média de $13,020 \times 10^3$ UFC/mL.

Com estes resultados, pode-se afirmar que a emissão de luz fez com que houvesse uma inibição do crescimento bacteriano, já que na maioria das diluições as UFCs/mL foram menores quando a suspensão de extrato e bactéria foi submetida a radiação luminosa. Assim, evidenciamos o potencial fotodinâmico da *Bidens sulphurea* para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. Nota-se, porém que para a diluição $\frac{1}{4}$ não ocorreu diminuição das UFCs/mL e sim um aumento das mesmas, além do fato desta diluição ter sido a única que não obedeceu ao crescimento linear de diminuição da concentração de extrato versus aumento de UFC, este fato foi inusitado e requer maiores estudos sobre o comportamento desta diluição.

Além disso, pode-se afirmar que o extrato de *Bidens sulphurea* mostrou-se citotóxico para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, uma vez que mesmo nas menores concentrações do extrato a houve significativa redução do crescimento bacteriano se comparado à suspensão sem a presença do mesmo; para a solução mais diluída de *Bidens sulphurea* $\frac{1}{32}$, sem a presença de luz, houve uma redução de aproximadamente 34% das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro, este resultado nos mostra o grande potencial desta planta para inibição do crescimento de bactérias, seja na presença de luz ou não.

Através do gráfico a seguir (Figura 8) é possível visualizar a inibição de crescimento bacteriano causado pelo extrato bruto de *Bidens sulphurea*. A inibição em presença de luz poderia ter sido maior caso a luz fornecida pelo sistema de irradiação tivesse o pico máximo de emissão exatamente no valor máximo de absorção do extrato bruto de *Bidens sulphurea* (com comprimento de onda de aproximadamente 385nm, região do ultravioleta, como foi mostrado na figura 7).

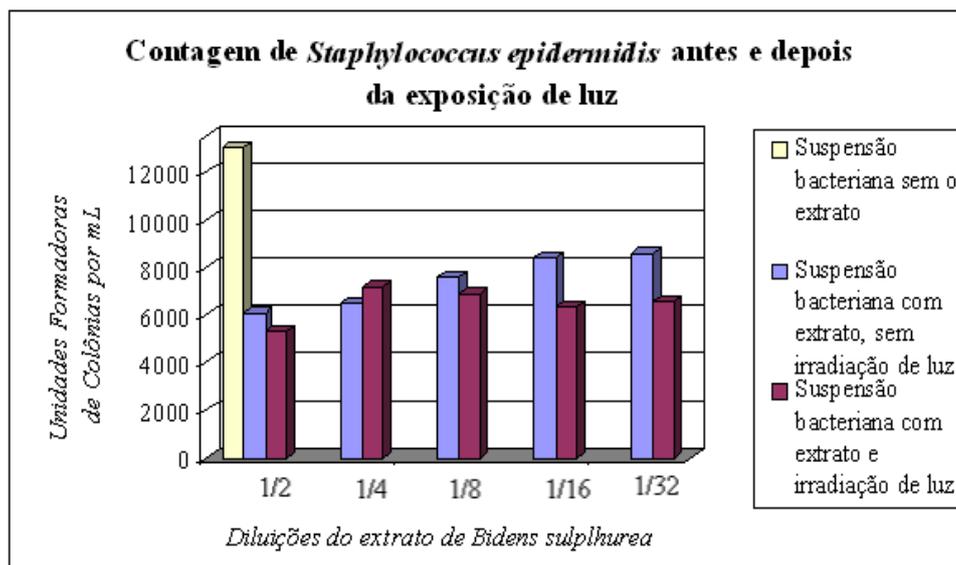


Figura 8: Gráfico da inibição de *Staphylococcus epidermidis* em diferentes concentrações do extrato bruto de *Bidens sulphurea*.

4. CONCLUSÃO

O extrato bruto de *Bidens sulphurea* foi eficiente na fotoinativação da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, evidenciando que componentes desta planta poderão ser caracterizados e isolados, obtendo um fotossensibilizador que possa ser utilizado para fins terapêuticos. É necessário um maior aprofundamento na toxicidade deste extrato, além de estudos mais amplos sobre quais microorganismos poderão ser tratados com o mesmo.

Apesar da toxicidade do extrato ter se mostrado relativamente baixa, deve-se ainda pesquisar o comportamento dos princípios ativos da planta em extratos com diferentes solventes, além do aprimoramento da fonte de irradiação luminosa, que deve ser construída de modo que a ativação dos compostos de *Bidens sulphurea* seja mais efetivamente.

Uma vez que a *Bidens sulphurea* é uma planta tão pouco estudada pela comunidade científica, ainda há muito que se pesquisar sobre os compostos presentes na mesma, seja eles ativados pela luz ou não, sendo este trabalho apenas um pequeno começo de uma vasta pesquisa científica.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UFU) pelo auxílio financeiro concedido e aos meus companheiros de LaBioFot pela amizade, ajuda e compreensão.

4. REFERÊNCIAS

- ACKROYD R, KELTY C, BROWN N, REED M. (2001): The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 74(5): 656-69
- BERTOLONI, G., ROSSI, F., VALDUGA, G., JORI, G. E VAN LIER, J.; *FGMS Microbiol, Lett.* 1990, 71:149-156
- BERTOLONI, G., ROSSI, F., VALDUGA, G., JORI, G., ALI, H. E VAN LIER, J.; *Microbios.* 1992, 71:33-46
- CHANG et al. *Journal of Ethnopharmacology* 2007 112 232–236.
- DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005, vol 49(6): 2329-2335.
- HAMBLIM, R.M; NEWMAN, E.L.; *J. Photochem.Photobiol.*, 13, 3 (1994).
- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T.; *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3, 436.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. *Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras*, 2001, 3º ed., Inst. Plantarum, SP.
- MACHADO, A. E. H.; *Química Nova*, 23: 237 (2000).
- MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.-M.; LEHN, N.; ABELS, C.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 1542.
- PAULA, L. F.; SANTOS, R.O; MENEZES, H. D.; BRITTO, J. R.; VIEIRA JR., J. B.; GONTIJO FILHO, P. P.; OLIVEIRA, C. A.; *A Comparative Study of Irradiation Systems for Photoinactivation of Microorganisms. Journal of Brazilian Chemical Society.* V. 21, nº 4, 2010 p. 694 – 700.
- PELCZAR JR., J.M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações.* São Paulo: MAKRON Books, 1996. 517 p. volume II.
- VENABLE, D.L.; LEVIN, D.A. 1983. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. *Plant Systematic Evolution*, 143:1-16.

VON TAPPEINER, J. A. (1904): H. (1900): Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Dtsch. Arch. Klin. Med. 80: 427-8