

## EFEITO FOTODINÂMICO DA RIBOFLAVINA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *STREPTOCOCCUS MUTANS*

A. Baptista\*, L.S.A. Melo\*\*, I.T. Kato\*, S.C. Núñez\*, R.E. de Araujo\*\*, M.S. Ribeiro\*

\* Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

\*\* Laboratório de Óptica Biomédica e Imagem, Departamento de Eletrônica e Sistemas, UFPE, Recife, Brasil

e-mail: alessandrabap@usp.br

**Resumo:** A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma técnica que envolve a ativação de um fotossensibilizador (FS) por uma fonte de luz ressonante ao comprimento de onda do FS, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio, capazes de induzir a morte celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de *Streptococcus mutans*, através da aPDT, usando como fotossensibilizador a riboflavina associada a nanopartículas de prata revestidas com pectina na concentração de 0,35 $\mu$ M e um diodo emissor de luz (LED) de emissão em  $\lambda = 455 \pm 20$  nm com taxa de fluência de 90 mW/cm<sup>2</sup> e expostas a tempos de irradiação de 2, 4 e 6 min. Os resultados mostraram que o uso da riboflavina como fotossensibilizador associado a nanopartículas de prata aumentou a eficiência da aPDT, reduzindo em 3 logs o número de células viáveis. Além disso, observou-se que o efeito fotodinâmico foi fluência-dependente.

**Palavras-chave:** redução bacteriana, LED de emissão azul, nanopartículas metálicas.

**Abstract:** Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a technique that involves the activation of a photosensitizer by a resonant light, resulting in the formation of reactive oxygen species capable of inducing cell death. The purpose of this study was to evaluate the susceptibility of *Streptococcus mutans* through the aPDT, using riboflavin as a photosensitizer associated with silver-pectin nanoparticles, at a concentration of 0,35 $\mu$ M, and a light emitting diode (LED) with an emission band centered at  $\lambda = 455 \pm 20$  nm, fluence rate of 90 mW/cm<sup>2</sup>, and exposure times of 2, 4 and 6 min. The results showed that the use of riboflavin as a photosensitizer associated with silver-pectin nanoparticles has improved the efficiency of aPDT, reducing the number of viable cells in 3 logs. Furthermore, this effect was observed in a fluence-dependent manner.

**Keywords:** bacterial reduction, blue LED, metallic nanoparticles.

### Introdução

As lesões de cárie mantiveram-se com uma baixa incidência até o século XIX, mas devido à revolução

industrial, começaram a ser desenvolvidos produtos industrializados utilizando açúcar refinado, o que provocou grande aumento na prevalência de lesões cáries, tornando-se em meados do século XX, a situação mais severa já observada da doença em populações humanas [1]. Atualmente, no estudo da cárie dental, é importante distinguir o conceito de doença, do conceito de lesão. Para que o indivíduo seja portador da doença cárie, basta ter sido infectado por microrganismos cariogênicos, destacando-se o *Streptococcus mutans*, mesmo sem a prevalência de lesões cáries. A progressão da cárie, ou o processo de reversão da mesma, é determinado pelo balanço entre os fatores de proteção e os fatores patológicos [2].

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) combina um fotossensibilizador (FS) não tóxico no escuro com uma fonte de luz de comprimento de onda ressonante para excitar o FS no seu estado tripleto reativo, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) tais como o oxigênio singleto e radical hidroxila, que são tóxicos para as células [3,4]. A riboflavina, também conhecida como vitamina B2, pode ser utilizada como FS, uma vez que seu rendimento na produção de oxigênio singleto é de 0,54 +/- 0,07. Esta molécula apresenta banda de absorção na região do azul, podendo ser uma ferramenta interessante na odontologia, uma vez que os cirurgiões dentistas usam a luz azul para cura de compósitos resinosos.

Na odontologia, a aPDT é utilizada na redução de microrganismos na periodontia, endodontia e na dentística. Particularmente na doença cárie, um dos maiores responsáveis é *Streptococcus mutans* e a literatura reporta que *S. mutans* pode ser inativado através da aPDT [5]. Para aumentar a efetividade da aPDT, nanopartículas metálicas têm sido utilizadas [6].

Materiais nanoparticulados são aglomerados de átomos com forma esférica, cúbica, e em forma de agulha, com cerca de 5 a 100 nm. O efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata está relacionado ao seu tamanho reduzido, que lhes permite interagir com a membrana celular e penetrar na célula microbiana. Plasmons localizados em filmes de prata descontínuos (sistema em 2-dimensão) proporcionam um aumento da produção de oxigênio reativo sob excitação de luz. A superfície metálica também tem a

capacidade de aumentar a geração de oxigênio singlete durante a aPDT devido à interação do FS com as nanopartículas [7,8]. Mais recentemente, o fenômeno foi explorado em sistemas aquosos por Melo e colaboradores [9], que verificaram o aumento da produção do oxigênio singlete com associação de riboflavina (Rb) e nanopartículas de prata revestidas com pectina (NPAg).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito fotodinâmico da riboflavina associada a nanopartículas de prata revestidas com pectina em *S. mutans*.

### Materiais e métodos

Para os ensaios microbiológicos foi utilizada cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

As cepas de *S. mutans* foram repicadas em *brain infusion heart* (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Decorrido o tempo de incubação, colônias dos microrganismos foram suspensas em *phosphate buffered saline* (PBS) e a turvação da suspensão celular foi ajustada em espectrofotômetro ( $\lambda=540$  nm) em uma densidade óptica de 0,15, correspondente a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

NPAg com dimensões de  $13 \pm 4$  nm foram usadas na concentração de  $8,3 \times 10^{12}$  NPAg/mL. Riboflavina (Sigma-Aldrich) foi diluída em água e em suspensão de NPAg na concentração de 0,35  $\mu$ M e usada como FS.

As amostras foram divididas em 6 grupos como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Padronização dos grupos.

GRUPOS	TEMPOS DE IRRADIAÇÃO
GRUPO CONTROLE	0
GRUPO LED	6 min
GRUPO NPAg	0 e 6 min
GRUPO Rb	0, 2, 4 e 6 min
GRUPO NPAg + Rb	0, 2, 4 e 6 min

A suspensão bacteriana foi colocada em placa de 96 poços e irradiadas com um diodo emissor de luz (LED) de emissão em  $\lambda=455 \pm 20$  nm (MMOPTICS, São Carlos, Brasil) com potência de 200 mW e taxa de fluência de 90 mW/cm<sup>2</sup> e expostas a tempos de irradiação de 2, 4 e 6 min. O tempo de pré-irradiação foi de 10 min para todos os grupos.

Foram realizadas diluições seriadas na ordem de 1/10, com finalidade de diminuir a concentração de UFC/mL para a contagem final. Com uma pipeta multicanal, dez- $\mu$ L por diluição foram inoculados em

placas de Petri de BHI. As placas foram feitas em triplicata em três diferentes dias para cada amostra (n=9) e colocadas em estufa bacteriológica a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. As UFC encontradas foram multiplicadas pelo fator de diluição e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por t-test. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

### Resultados

Foi possível observar que a riboflavina e as nanopartículas de prata revestidas com pectina, sozinhas ou associadas, não demonstraram nenhuma toxicidade às células bacterianas após o período de incubação de 10 min no escuro ( $p > 0,05$ ). O mesmo foi observado para o grupo submetido somente ao LED por 6 min (fig. 1). O grupo só com Rb irradiada mostrou menos que 1 log de redução de células bacterianas após 6 min (fig. 1), enquanto que quando a Rb foi associada a NPAg, a redução observada foi de aproximadamente 3 logs ( $p < 0,05$ ) (fig. 2).

Além disso, observa-se que o efeito fotodinâmico foi fluência-dependente. Após 2 min de irradiação, observa-se uma redução bacteriana menor que 1 log, enquanto que para 4 min de irradiação, o número de células viáveis reduziu em aproximadamente 1,5 log. Após 6 min de exposição, a viabilidade de *S. mutans* diminuiu em 3 logs (fig. 2).

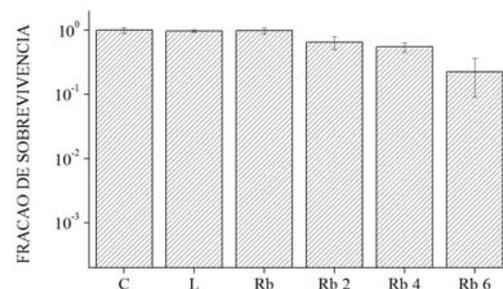


Figura 1: Fração de sobrevivência de *S. mutans*  $\pm$  DP. Grupos controle (C), riboflavina (Rb) e LED (L) não demonstram nenhuma toxicidade em células bacterianas. Riboflavina associada ao LED de emissão azul mostra redução de menos de 1 log no número de células viáveis após 6 min de irradiação ( $p > 0,05$ ).

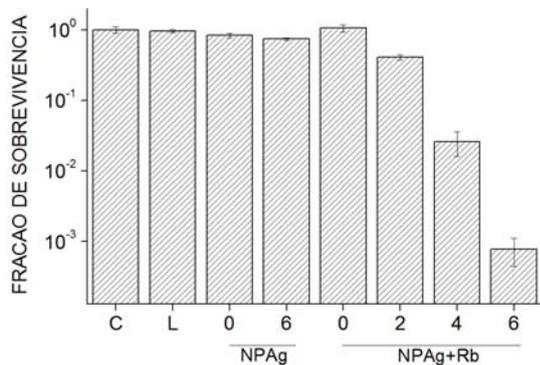


Figura 2: Fração de sobrevivência de *S. mutans* ± DP. Riboflavina associada a nanopartículas de prata irradiadas com um LED de emissão azul demonstraram redução de 3 logs no número de células viáveis ( $p < 0,05$ ) e o efeito fotodinâmico foi fluência-dependente.

### Discussão

Diversos estudos têm reportado que a aPDT é capaz de reduzir bactérias orais em suspensão e em biofilme [10,11,12,13]. As propriedades fotossensibilizantes da riboflavina estão bem estabelecidas e têm sido utilizadas com sucesso na aPDT [14,15]. No presente estudo, nós investigamos o efeito fotodinâmico da associação da riboflavina com nanopartículas de prata revestidas com pectina em *S. mutans*.

Para um bom desempenho da aPDT é fundamental que durante o processo fotodinâmico o suprimento de oxigênio seja superior ao seu consumo. Assim, quando se deseja melhorar o desempenho dos fotossensibilizadores, trabalha-se para aumentar seu rendimento de oxigênio singlete, que fica em torno de 0,2 a 0,7, ou seja, 20 a 70% para os diferentes fotossensibilizadores utilizados na aPDT [16]. Estudos na literatura verificaram que a associação de moléculas fluorescentes a superfícies metálicas não só promovem a amplificação da fluorescência, pelo aumento da população no estado singlete de menor energia, como aumentam a probabilidade de ocorrer o cruzamento intersistemas e a consequente produção de oxigênio singlete [17,18]. O aumento observado na fosforescência foi explicado pela transferência de energia dos elétrons da superfície plasmônica de um filme de prata não contínuo para o FS [7,8].

Em estudo anterior [9], observou-se um aumento de 28,5% na produção de oxigênio singlete quando NPAg revestidas com pectina foram adicionadas à solução de riboflavina no processo de efeito fotodinâmico. A partir do resultado exposto na figura 2, pôde-se quantificar a ação fotodinâmica no processo antimicrobiano devido a interação NPAg-Riboflavina.

É importante ressaltar que nosso objetivo foi avaliar se a utilização de nanopartículas de prata revestidas com pectina associadas à riboflavina poderia

potencializar a aPDT através da intensificação da produção de oxigênio singlete. Assim, foram utilizados parâmetros subletais para *S. mutans* nos ensaios onde utilizamos somente a Rb associada ao LED de emissão azul. Por esta razão, observamos redução menor que 1 log, mesmo depois de 6 min de irradiação.

Em contrapartida, nossos resultados também mostraram que a morte bacteriana foi dependente dos parâmetros utilizados quando a Rb foi associada às NPAg. De fato, a produção de espécies reativas de oxigênio é reportada na literatura como o principal fator citotóxico em aPDT [19,20], no entanto, Prates e colaboradores [21] verificaram que a velocidade de formação de ROS pode ser afetada pelos parâmetros de irradiação, resultando em diferentes quantidades de morte celular. Estudos *in vivo* devem ser realizados para investigação do uso de NPAg associadas a FS para otimização da aPDT.

### Conclusão

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a aPDT associando a riboflavina às nanopartículas de prata revestidas com pectina, demonstram significante redução de *S. mutans* viáveis.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, CNPQ e FACEPE o apoio financeiro para realização deste trabalho.

### Referências

- [1] Porto CLA, Pereira JC, Netto CA e Colaboradores. Cariologia. Artes Médicas. 2008. p. 1-14.
- [2] Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. ADA. 2000; 131:887-899.
- [3] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coordination Chemistry Reviews. 2002; 233:351-371.
- [4] Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. The Oncologist. 2006; 11(9):1034-1044.
- [5] Baptista A, Kato IT, Prates RA, Suzuki LC, Rael MP, Freitas AZ, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. Photochemistry and Photobiology. 2012; 88:584-589.
- [6] Pagonis TC, Che J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. J. Endod. 2010; 36(2):322.
- [7] Zhang Y, Aslan K, Previte MJR, Geddes CD. Metal-enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields. Journal of Fluorescence. 2007; 17:345-349.
- [8] Zhang Y, Aslan K, Previte MJR, Geddes CD. Plasmonic engineering of singlet oxygen generation. PNAS. 2008; 105(6):1798-1802.

- [9] de Melo LSA, Gomes ASL, Saska S, Nigoghossian K, Messaddeq Y, Ribeiro SJL, de Araujo RE. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. *Journal of Fluorescence*. 2012; 22: 1633-1638.
- [10] Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, Gomes L, Ribeiro MS. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86(1):70-6.
- [11] Costa AC, Chibebe Jr J, Pereira CA, Machado AK, Beltrame Jr M, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz Oral Res*. 2010; 24:413-418.
- [12] Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114:64-69.
- [13] Araújo NC, Fontana, CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci*. 2014; 29:629-635.
- [14] Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005; 79:159.
- [15] Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Baumler W. Singlet Oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophysical Journal*. 2006; 91:452.
- [16] Wainwright M. Photosensitizers in Biomedicine. 1<sup>o</sup> ed. John Wiley & Sons. 2009.
- [17] Lakowicz JR, Shen B, Gryczynski Z, D'auria S, Gryczynfor I. Intrinsic fluorescence from DNA can be enhanced by metallic particles. *Biochem Biophys Res Comm*. 2001; 286:875.
- [18] Geddes CD, Lakowicz, JR. Metal-enhanced fluorescence. *Journal of Fluorescence*. 2002; 12:121.
- [19] Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2004; 17:245-254.
- [20] Fuchs BB, Tegos, GP, Hamblin MR, Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007; 8:2929-2936.
- [21] Prates RA, Silva EGD, Yamada-Jr AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and fluence-dependent manner. *Laser Phys*. 2009; 5:1038-1044.