

## POTENCIAL DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *S. mutans* UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES CORANTES

SÁVIO BISINOTO DE LELES<sup>1</sup>; LÍVIA RODRIGUES SCHNEIDER<sup>2</sup>; ANDRÉ LINDEMANN DUTRA<sup>3</sup>; SONIA LUQUE PERALTA<sup>4</sup>; RAFAEL GUERRA LUND<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Odontologia - UFPEL – savio\_bisinoto@hotmail.com

<sup>2</sup> Faculdade de Odontologia – UFPEL - liviaschneider1@hotmail.com

<sup>3</sup> Faculdade de Odontologia – UFPEL – andrelindemann@hotmail.com

<sup>4</sup> Faculdade de odontologia - UFPEL – solupe@gmail.com

<sup>5</sup> Faculdade de odontologia - UFPEL – rafael.lund@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença que está relacionada com o acúmulo do biofilme dental e que está associada com o aumento do consumo de açúcares na dieta. O biofilme dental se forma na superfície dos dentes com o freqüente metabolismo de carboidratos, através da atividade de bactérias acidogênicas e acidúricas presentes na cavidade oral e que irão os açúcares em ácidos orgânicos (MARSH, 2003).

Quando uma comunidade de microorganismos torna-se intimamente aderida à superfície do dente na formação do biofilme, ela exibe propriedades fenotípicas distintas e tende a adquirir uma resistência maior a agentes antimicrobianos (HOYLE, 1993). Além disso, tendo em vista o crescente problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, o uso de uma terapia alternativa onde as bactérias seriam incapazes de adquirir resistência seria de grande importância (WILSON, 1993).

A fotomedicina é a divisão da medicina que utiliza luz no tratamento de doenças. Por razões históricas, e até mesmo por diferentes protocolos clínicos, ela é dividida em três: fototerapia (somente uso de luz); fotoquimioterapia (uso da luz associada a compostos químicos com excitação no UV) e TFD (terapia fotodinâmica) que faz uso de compostos fotossensibilizadores (FS) com excitação em diferentes comprimentos de onda do espectro visível (HOLICK, 1982). Os compostos fotossensibilizadores são colorantes (corantes e pigmentos) caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível. Cerca de 10.000 desses compostos químicos coloridos têm sido produzidos em escala industrial (ZOLLINGER, 2003).

A TFD consiste no uso de FS que são ativados por diferentes comprimentos de onda de luz visível na presença de oxigênio. O primeiro passo desse processo é a administração do FS ao paciente de modo tópico ou sistêmico, por determinado período de tempo (tempo de pré-irradiação), a fim de possibilitar a biodistribuição do FS. Depois disso, o sítio de tratamento é irradiado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS inicia reações fotoquímicas que produzem espécies reativas de oxigênio, produtos citotóxicos, que resultarão no efeito terapêutico desejado (SABINO, 2013).

Esta técnica apresenta como vantagens: ser de aplicação rápida, tópica, não invasiva, que elimina rapidamente as bactérias após uma breve exposição à luz e que apresenta pouca possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana, considerando o oxigênio como fator tóxico para espécies reativas a ele (anaeróbicas) (NIKOLAOS, 2011).

Desde o início do século, tem-se discutido o emprego de colorantes como drogas. Certos corantes têm sido empregados como agentes terapêuticos, como é o caso do azul de metileno, que possui ação bacteriostática; violeta de genciana (cristal violeta); dentre outros (MACHADO, 2008).

Partindo deste princípio, este estudo avaliou e comparou o potencial antimicrobiano do verde malaquita (VM), azul de orto toluidina (AOT) e azul de metileno (AM) quando usados na TFD, em modelo de monocultura de biofilme de *S. mutans*.

## 2. METODOLOGIA

### Preparo dos espécimes

Incisivos bovinos, previamente selecionados, foram submetidos à secção circular na região central da coroa dentária, com o auxílio de uma cortadeira de 6mm de diâmetro. Com isso, foram obtidos discos de substrato dentário que foram fixados em matrizes metálicas de 2mm de espessura e levados a politriz para polimento, tanto da superfície de esmalte quanto de dentina, com lixas d'água de granulação decrescente de 240 a 600. Após isso, todos os discos, já inclusos em suportes de fio ortodôntico, foram autoclavados.

### Cultivo do biofilme

Neste estudo, foi utilizado o método de crescimento de biofilme em monocultura, utilizando cepas de *S. mutans* da linhagem UA159. Os microorganismos foram reativados adicionando 100 µl do inóculo bacteriano em 15ml de meio LMW (*Low Molecular Weight*) suplementado com 1% de sacarose. Em seguida, as misturas foram homogeneizadas em agitador de tubos Vórtex e incubadas em ambiente com 10% de CO<sub>2</sub> (microaerofilia) por 18 h. Após crescimento bacteriano, foi realizado o ajuste do inóculo bacteriano em caldo BHI para um padrão de turbidez correspondente à escala 0,5 de Mcfarland (1,5x10<sup>8</sup> UFC/ml). Para o cultivo do biofilme, foi utilizado o meio LMW suplementado com 10% de sacarose e composto de 1% do inóculo bacteriano ajustado. Os discos foram suspensos e imersos em placas de 24 poços com 2 ml do meio preparado. Depois disso, os meios foram incubados em ambiente de microaerofilia, à 37 °C, durante 3 dias. Os meios foram trocados em intervalos de 24h.

### Aplicação da TFD

No terceiro dia de crescimento bacteriano, os discos foram divididos em 5 grupos de acordo com o corante utilizado: TBO(azul de orto toluidina); VM(verde malaquita); AT(azul de tripan) CI(controle inicial – 72h) e CF(controle final – 96h), e foi realizada a TFD. Na TFD, 0,2ml do fotossensibilizante foi aplicado sobre a superfície do disco de esmalte, e após 4 min (tempo de pré-irradiação), realizou-se a irradiação dos espécimes com feixe de luz vermelha na dose de 95 j/cm<sup>2</sup> durante 1min e 30s, a uma distância de 6mm do biofilme (COSTA et al., 2010). Depois de 24h, os discos de esmalte foram imersos em 1,0 ml de tampão fosfato salino e sonicados. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada de razão 10 das suspensões de biofilmes, e as concentrações das diluições de 5 a 10 foram inoculadas em meio ágar BHI e mantidas em ambiente de microaerofilia, à 37°C, por 48h. Após, foi realizada a contagem bacteriana determinando a viabilidade bacteriana dos biofilmes submetidos à TFD através da contagem de Unidade Formadoras de Colônias (UFC) por disco de esmalte.

### Análise Estatística

A leitura das placas foi realizada 48h após crescimento bacteriano e os dados foram analisados estatisticamente por meio do Teste t de Student para amostras independentes. Para isso foi utilizado o programa Sigma stat 3,5.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da viabilidade celular dos biofilmes submetidos à TFD estão representados na Figura 1. O verde malaquita revelou-se como um potente antimicrobiano para ser utilizado na TFD quando comparado com os demais corantes testados.

Paschoal (2009) demonstrou que a efetividade da TFD contra cepas de *S. mutans* dependia de uma concentração mínima do corante fotossensibilizador (2,5µg/ml), associada a uma densidade de energia mínima da fonte luminosa (24 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados de nosso estudo corroboram com aqueles encontrados por Paschoal (2009) realizando TFD com o azul de toluidina. Foi possível obtermos efeitos similares na TFD diminuindo a quantidade do corante aplicada e aumentando a densidade de energia.

Prates (2005) também já havia encontrado resultados promissores de TFD envolvendo a utilização do corante VM na concentração de 0,1%. Neste estudo, este fotossensibilizante foi submetido à irradiação com laser de luz vermelha de baixa intensidade e havia revelado efeito bactericida frente a cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que também é um importante patógeno encontrado no ambiente bucal.

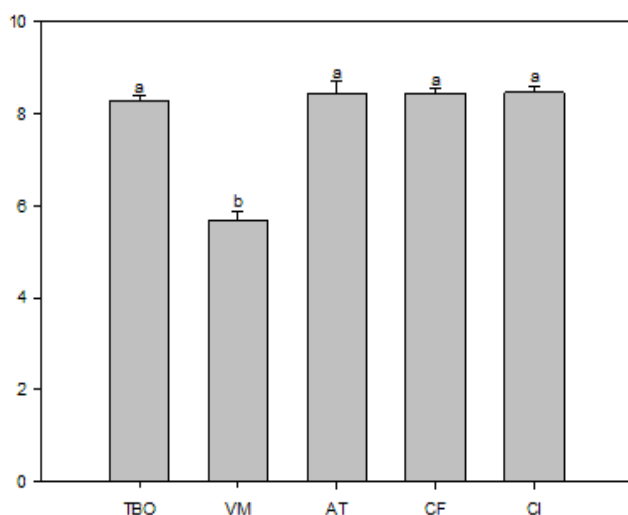


Figura 1: UFC/cm<sup>2</sup> em biofilmes formados sobre disco (valores expressos em log<sub>10</sub>).

Tabela 1. Média do pH do sobrenadante do meio de cultivo utilizado.

Corantes	Tempo de crescimento bacteriano		
	24h	48h	72h
TBO	<sup>A</sup> 5,8 (0,1) <sub>b</sub>	<sup>B</sup> 5,3 (0,0) <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 6,9 (0,1) <sub>a</sub>
VM	<sup>A</sup> 5,8 (0,0) <sub>b</sub>	<sup>B</sup> 5,3 (0,1) <sub>c</sub>	<sup>B</sup> 6,7 (0,2) <sub>a</sub>
AT	<sup>A</sup> 5,6 (0,1) <sub>a</sub>	<sup>B</sup> 5,3 (0,0) <sub>b</sub>	<sup>C</sup> 5,7 (0,1) <sub>a</sub>
CF	<sup>A</sup> 5,5 (0,1) <sub>a</sub>	<sup>B</sup> 5,3 (0,0) <sub>b</sub>	<sup>D</sup> 5,5 (0,1) <sub>a</sub>
CI	<sup>A</sup> 5,5 (0,1) <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 5,6 (0,1) <sub>a</sub>	---

N = 8 discos por grupo experimental

Diferentes letras indicam diferença estatística significativa. Letras maiúsculas diferença entre linhas. Letras minúsculas diferença entre colunas (p <0,05).

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que o corante verde malaquita utilizado na terapia fotodinâmica apresentou o melhor efeito antimicrobiano em biofilme de *S. mutans*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, A.; B.P.; CHIBEBE, J.J.; PEREIRA, C.A.; MACHADO, A.K.S.; BELTRAME, J. M, JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 24, n.4, p.413-418, 2010.

HOYLE, B.D.; WILLIAMS, L.J.; COSTERTON, J.W. Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Infection and Immunity**, EUA, v.61, n. 2, p. 777–780, 1993.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p.237-243, 2000.

MARSH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, Inglaterra, v. 149, n. 2, p. 279–294, 2003.

SOUKOS, N.S. ; GOODSON, J.M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, Dinamarca, v. 55, n. 1 p.143–166, 2011.

PASCHOAL, M.A. **Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças**. 2009. Tese (Mestrado em Odontopediatria), Pós-graduação em odontopediatria Faculdade de Odontologia de Bauru USP.

PRATES, R.A. **Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo *in-vitro***. 2005. Dissertação (Mestrado Profissional em Laser em Odontologia) – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo.

HOLICK, M.F.; MACLANGHLIN, J.A.; PARRISH, J.A. The photochemistry and photobiology of vitamin D3. IN: REGAN, J.D.; PARRISH, J.A.; **The Science of Photomedicine**. New York, London: Plenum Press; p.195-218. 1982.

SABINO, C.P.; RIBEIRO, M. Dosimetria na terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: NUÑEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S.; GARCEZ, A.S. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap.3, p.27-38.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **The Journal of Applied Bacteriology**, Inglaterra, v. 75, n. 4, p. 299–306, 1993.

ZOHLINGER, H. **Color Chemistry - Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments**. Weinheim: Wiley-VCH, 1991.