



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CHEYENNE MARÇAL DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO DA QUITOSANA À TERAPIA FOTODINÂMICA
PARA CONTROLE DE *Streptococcus mutans* E BIOFILME
MICROCOSMOS**

2020

CHEYENNE MARÇAL DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO DA QUITOSANA À TERAPIA FOTODINÂMICA PARA
CONTROLE DE *Streptococcus mutans* E BIOFILME MICROCOSMOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE do Programa de Pós Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Souza, Cheyenne Marçal de
Associação da quitosana à terapia fotodinâmica para controle de Streptococcus mutans e biofilme microcosmos / Cheyenne Marçal de Souza. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.
Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Streptococcus mutans. 3. Quitosana. 4. Clorina e6. 5. Biofilme. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Newton Soares da Silva

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IPeD

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 29 de abril de 2020.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Ciro** e **Maria**, por todo amor, incentivo e apoio incondicional. Esse trabalho é para vocês e por vocês.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **Ciro Marçal de Souza** e **Maria Dorvalina de Araújo** que sempre cuidaram de mim com todo amor e carinho, me protegendo e me orientando a sempre seguir pelo melhor caminho. Se cheguei até aqui foi graças ao esforço de vocês durante toda a vida, que não foi nada fácil, com muitos sacrifícios e dificuldades, mas nada os impediu de sempre tentar proporcionar o melhor para seus filhos. Obrigada por sempre me incentivarem a estudar, por serem quem são e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje, serei eternamente grata por tudo. Vocês são os melhores pais que alguém poderia querer.

À meu amor, **Leonardo de Carvalho Leonel**, por sempre caminhar ao meu lado nos melhores e nos piores momentos, me apoiar incondicionalmente e acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Por muitas vezes você foi a minha força tornando cada momento mais fácil. Obrigada por todo amor e cuidado, por toda a ajuda sendo estudando comigo ou simplesmente me dizendo que tudo ia dar certo. Você faz toda a diferença na minha vida e em nossas conquistas. Estarei sempre com você, com muito amor.

Aos meus irmãos, **Rian**, **Diane** e **Jeyson**. Obrigada por crescerem ao meu lado como meus amigos, por cuidarem de mim e estarem comigo em todos os momentos bons e ruins, vocês tornaram minha vida muito melhor.

À minha orientadora, Profa. Assoc. **Juliana Campos Junqueira**, meu maior exemplo de professora, orientadora e pesquisadora. Obrigada por me acolher e aceitar me orientar mesmo quando você já tinha tantos alunos e projetos, com certeza não é fácil, mas todo seu empenho para cuidar de todos é admirável e é fácil ver como faz isso com todo carinho. Obrigada por estar sempre a disposição quando precisei, por todo o aprendizado que me proporcionou, todo apoio, paciência, incentivo e confiança durante esse tempo.

À Profa. Assoc. **Estela Kaminagakura Tango**, minha primeira orientadora do mestrado, meus sinceros agradecimentos por tudo o que me ensinou durante o tempo que me orientou, por todos os conselhos e por acreditar em minha capacidade.

À **Maíra Terra García**, minha parceira, amiga e excelente profissional, obrigada por tornar esse trabalho possível. Você esteve comigo desde que cheguei ao laboratório, me acolheu, me ensinou tantas coisas e sempre me ajudou durante o desenvolvimento dos experimentos. Muita gratidão a você.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa. Assoc. **Rebeca Di Nicoló**.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Assoc. **Luciane Dias de Oliveira**.

À todos os docentes do Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal por todo conhecimento compartilhado. Especialmente à Profa. Dra. **Liliana Scorzoni** e Profa. Assoc. **Ana Lia Anbinder**, grandes exemplos de profissionais que fizeram toda a diferença durante minha formação. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos diretamente e por simplesmente me darem a oportunidade de observá-las trabalhando.

Às professoras, Profa Dra. **Vânia Maria Maciel Melo** e Profa. Dra. **Juliana Ferreira Strixino** pela colaboração no fornecimento de materiais para execução desse trabalho.

Aos colegas e amigos que a pós-graduação me deu, **Andressa, Bruna, Daiane, Evelyn, Felipe, Hanna, Jaqueline, Keila, Lívia, Nayara, Raquel, Renata, Rodnei, Patrícia, Thais e Victor**. Obrigada por me acolherem, por toda ajuda, por todos os ensinamentos que me transmitiram, por todas as caronas que me deram, por todos os almoços e cafés e por simplesmente me fazerem rir. Estar ao lado de excelentes profissionais como vocês com certeza me fez crescer muito e eu nunca esquecerei tudo o que fizeram por mim.

Aos amigos da graduação, **Abraão, Álefe, Andréa, Andrielle, Caio, Douglas, Hana, Maiara, Marcellus, Marcos e Suzanne**, vocês foram indispensáveis no início da minha vida científica, se apaixonaram comigo pela biologia dia após dia e compartilharam cada momento dessa caminhada. Obrigada por fazerem parte dessa jornada, vocês são incríveis.

Aos docentes da Universidade do Vale do Paraíba, Profa. Dra. **Cristina Pacheco**, Profa. Dra. **Flávia Villaça**, Profa Dra. **Karla Lopes**, Prof. Dr. **Luiz Carlos Pires**, Profa. Dra. **Maricilia Silva Costa**, Profa Dra. **Nádia Campos Velho**, Prof. Dr. **Newton Soares** e Profa. Dra. **Walderez Moreira Joaquin**. Obrigada por me ensinarem tanto desde o início da minha graduação e por despertarem em mim o amor pela ciência e pela pesquisa.

À **Thais Paradella**, por toda a ajuda com os testes de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À todos os funcionários da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, por estarem sempre dispostos à ajudar.

*À Coordenação de Apoio a Pesquisa (**CAPES**) pela concessão da bolsa de mestrado no período de setembro de 2019 a abril de 2020.*

“Somos feitos de poeira de estrelas! A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimentos. É uma maneira de pensar.”

– Carl Sagan.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1 Objetivo geral	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Ativação da cepa padrão de <i>S. mutans</i>	22
3.2 Fotossensibilizador e Fonte de Luz.....	22
3.3 Preparo da solução de quitosana	23
3.4 Ação da terapia fotodinâmica sobre <i>S. mutans</i> em culturas planctônicas..	23
3.4.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>S. mutans</i>	23
3.4.2 Teste de sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana	24
3.4.3 Determinação do número de UFC/mL	25
3.5 Ação da terapia fotodinâmica sobre biofilme de <i>S. mutans</i> formados em esmalte bovino	26
3.5.1 Confecção dos corpos-de-prova de dente bovino	26
3.5.2 Formação do biofilme de <i>S. mutans</i> sobre os corpos-de-prova de dentes bovinos.....	28
3.5.3 Teste de sensibilidade à terapia Fotodinâmica antimicrobiana sobre biofilme de <i>S. mutans</i>	29
3.5.4 Análise dos efeitos da TFD sobre os biofilmes de <i>S. mutans</i> por meio da determinação do número de células viáveis (UFC/mL)	30
3.5.5 Análise dos efeitos da TFD sobre os biofilmes de <i>S. mutans</i> por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.6 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de <i>S. mutans</i>	31
3.7 Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica com quitosana sobre biofilmes microcosmos orais	32
3.7.1 Comitê de ética.....	32
3.7.2 Seleção dos voluntários e coleta de material	32
3.7.3 Formação dos biofilmes microcosmos	33
3.7.4 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	33
3.7.5 Contagem de UFC/mL.....	34

3.8 Análise dos resultados obtidos	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de <i>S. mutans</i> por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	35
4.2 Ação da Terapia Fotodinâmica em biofilmes de <i>S. mutans</i> por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)	36
4.3 Análise da ação da terapia fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.4 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de <i>S. mutans</i>	41
4.5 Ação da terapia fotodinâmica em biofilmes microcosmos orais por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS*	53
ANEXO	61

Souza CM. Associação da quitosana à terapia fotodinâmica para controle de *Streptococcus mutans* e biofilme microcosmos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que combina um fotossensibilizador (FS) com luz visível e oxigênio molecular, podendo ser utilizada como agente antimicrobiano no controle de diversas doenças infecciosas, como a cárie dentária. A quitosana vem demonstrando atividade promissora quando associada à alguns fotossensibilizadores. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar a associação da quitosana com o fotossensibilizador Photodithazine® (PDZ) na TFD sobre culturas planctônicas e biofilmes de *S. mutans*, bem como avaliar sua eficácia sobre biofilmes microcosmos orais. Inicialmente, foi preparada uma suspensão de *S. mutans* UA 159 padronizada em 10^6 células/mL. Para o estudo em culturas planctônicas, foi adicionada a suspensão de *S. mutans* em placas de 96 poços. Para o estudo em biofilmes, foram confeccionadas amostras de esmalte de dentes bovinos como substrato para a formação do biofilme em placas de 24 poços. As culturas planctônicas e os biofilmes foram tratados de acordo com os grupos experimentais, recebendo adição de PDZ, quitosana ou PBS, seguido pela irradiação ou pela manutenção em ambiente escuro (controle). Os efeitos dos tratamentos foram analisados por meio da contagem de UFC/mL de *S. mutans* em ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) incubadas por 48h a 37°C (5% de CO₂) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Além disso, para confirmar a penetração do FS e da quitosana nas células de *S. mutans* foi realizado teste de absorvância. A seguir, foram estudados os efeitos da terapia fotodinâmica com PDZ associado à quitosana sobre biofilmes microcosmos de saliva formados sobre corpos-de-prova de esmalte bovino. Os efeitos da TFD sobre os biofilmes foram analisados por meio da contagem de células viáveis de micro-organismos totais em ágar BHI e estreptococos do grupo *mutans* em ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS). Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Os resultados demonstraram que a TFD mediada por PDZ foi capaz de reduzir a contagem de células viáveis de *S. mutans* tanto nos testes planctônicos como nos biofilmes, assim como reduzir a contagem de micro-organismos totais e estreptococos do grupo *mutans* em biofilmes microcosmos orais. Esses efeitos antimicrobianos foram ainda maiores quando a quitosana foi associada à TFD. A redução do número de células viáveis foi confirmada nas imagens de MEV, nas quais pode-se observar a desestruturação das células e matriz do biofilme. Nos testes de absorção, observou-se que a quitosana aumentou a capacidade de penetração do PDZ nas células de *S. mutans*. Concluiu-se que a quitosana apresentou capacidade de potencializar a atividade antimicrobiana da TFD mediada por PDZ sobre *S. mutans* e biofilmes microcosmos orais.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Streptococcus mutans*. Quitosana. Clorina e6. Biofilme.

Souza CM. Association of Photodynamic Therapy with chitosan for the control of *Streptococcus mutans* and microfilm biofilm [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a technique that combines a photosensitizer (FS) with visible light and molecular oxygen and can be used as an antimicrobial agent to control various infectious diseases, such as dental caries. Chitosan has shown promising activity when associated with some photosensitizers. Therefore, the objective of this study was to investigate the association of chitosan with the Photodithazine® photosensitizer (PDZ) in PDT on *S. mutans* planktonic cultures and biofilms, as well as evaluating its effectiveness on oral microcosm biofilms. Initially, a standardized *S. mutans* UA159 suspension at 10^6 cells/mL was prepared. For the study in planktonic cultures, the suspension of *S. mutans* in 96 well plates was added. For biofilm study, bovine tooth enamel samples were made as substrate for biofilm formation in 24 well plates. Planktonic cultures and biofilms were treated according to the experimental groups, receiving the addition of PDZ, chitosan or PBS, followed by laser irradiation or maintenance in a dark environment (control). The effects of treatments were analyzed by counting CFU/mL of *S. mutans* on Brain Heart Infusion Agar (BHI) incubated for 48h at 37 °C (5% CO₂) and Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition, to confirm the penetration of PS and chitosan in *S. mutans* UA159 cells, an absorbance test was performed. Next, the effects of photodynamic therapy with PDZ associated with chitosan on saliva microcosm biofilms formed on bovine enamel specimens were studied. The effects of PDT on biofilms were analyzed by counting viable cells of total microorganisms on BHI agar and mutans streptococci on Mitis Salivarius Bacitracin Sucrose (MSBS) agar. The data were analyzed by ANOVA and Tukey's test. The results demonstrated that PDZ-mediated PDT was able to reduce the viable cell count of *S. mutans* in both planktonic and biofilm tests, as well as to reduce the count of total microorganisms and mutans streptococci in oral microcosm biofilms. These antimicrobial effects were even greater when chitosan was associated with PDT. The reduction in the number of viable cells was confirmed in the SEM images, in which it is possible to observe the breakdown of the cells and the biofilm matrix. In the absorption tests, it was observed that chitosan increased the penetration capacity of PDZ in *S. mutans* cells. It was concluded that chitosan was able to potentiate PDZ-mediated PDT antimicrobial activity on *S. mutans* and oral microcosm biofilms.

Keywords: Photodynamic therapy. *Streptococcus mutans*. Chitosan. Chlorin e6. Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana é colonizada por uma comunidade bacteriana altamente diversificada, consistindo em mais de 700 espécies bacterianas (Soria-Lozano et al., 2015). Essas espécies interagem entre si e com outros micro-organismos formando comunidades microbianas, envolvidas em uma matriz de polímeros de origem bacteriana ou do próprio hospedeiro, denominadas biofilme dentário (Socransk, Haffajee, 2002). A ocorrência de alterações em fatores que regulam a homeostase da cavidade bucal, como a composição da dieta do indivíduo, a resposta do sistema imunológico e a integridade da dentição podem modificar a proporção dos micro-organismos permitindo a proliferação de espécies patogênicas que levam ao surgimento de doenças bucais, como a cárie dentária (Marsh, 2010).

A cárie dentária afeta cerca de 2.430 milhões de pessoas no mundo (Leal et al., 2017), sendo caracterizada como uma doença de etiologia multifatorial, biofilme-dependente e associada à ingestão frequente de carboidratos na dieta, principalmente a sacarose. A fermentação desses carboidratos pelos micro-organismos presentes no biofilme leva à produção de ácidos, que resultam na diminuição do pH da cavidade bucal (Marsh, 2010; Llana-Puy, 2006). Quando o valor crítico do pH é atingido (inferior a 5,5) inicia-se a dissolução dos minerais do esmalte dentário pela ação de íons de cálcio e fosfato, ocorrendo então a desmineralização da superfície dentária que progride em profundidade (Touger-Decker, Loveren, 2003). A ingestão frequente de carboidratos antes do reestabelecimento do pH, faz com que o processo de desmineralização se torne contínuo, levando a perda da estrutura mineral e conseqüentemente ao aparecimento da lesão de cárie (Aoba, 2004).

As bactérias que estão intimamente relacionadas à cárie dentária são os estreptococos, os primeiros micro-organismos a colonizarem as superfícies da cavidade bucal. Cerca de 70% das bactérias cultiváveis existentes no biofilme dentário humano são estreptococos do grupo *mutans* (Soria-Lozano et al., 2015). Os estreptococos são bactérias Gram-positivas, esféricas, que se agrupam geralmente em pares ou cadeias durante seu crescimento. São fermentadores de carboidratos provenientes da dieta do indivíduo, acidogênicos (capazes de produzir ácidos) e

acidúricos (capacidade de permanecer em ambiente ácido), produtores de polissacarídeos extracelulares e possuem capacidade de adesão às estruturas dentárias, sendo a aderência a primeira etapa na formação do biofilme bacteriano (Cheon et al., 2013; Durso et al., 2014; Manoil et al., 2014)

S. mutans normalmente existe como um membro regular da comunidade do biofilme maduro, no entanto, em certas condições, pode tornar-se dominante e assim causar doenças (Kreth et al., 2005). Tamura et al. (2009) sugerem que os isolados de *S. mutans* possuem maior capacidade de formar biofilme do que isolados de outras espécies de estreptococos que colonizam o ambiente da cavidade bucal humana. A formação de biofilme por *S. mutans* é um dos principais fatores de virulência do micro-organismo, possível pela produção de glicosiltransferases (GTFS), que hidrolizam a sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas para formar glicanos insolúveis que conferem aos micro-organismos a capacidade de se aderir às superfícies lisas dos dentes (Ren et al., 2016).

Devido a alta prevalência da cárie dentária na população, vários métodos alternativos para tratamento dessa doença tem sido investigados, como a terapia fotodinâmica (TFD) (Panhóca, 2011). No contexto geral, o efeito da terapia fotodinâmica (TFD) ocorre na presença de oxigênio molecular e com a interação de um fotossensibilizador (FS) atóxico à uma fonte de luz visível, com comprimento de onda adequado para excitar as moléculas fotoativas (Rkein, Ozog, 2014).

A utilização clínica da TFD como método terapêutico ocorreu após aprovação das porfirinas e seus derivados nos EUA, sendo utilizada contra câncer de pulmão, esôfago e displasias (Kou et al., 2017). Mais tarde, a terapia fotodinâmica passou a ser utilizada também no tratamento de doenças infecciosas, sendo chamada por alguns autores de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Entretanto, os estudos com TFD ficaram estagnados por um longo período, devido à descoberta dos antibióticos que se mostravam muito eficazes para a inibição do crescimento microbiano. Após algumas décadas, devido ao uso indiscriminado desses fármacos, surgiram cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e os estudos com TFD voltaram a despertar o interesse de pesquisadores (Caires et al., 2017).

A TFD para controle de micro-organismos tem sido constantemente aperfeiçoada, explorando vários aspectos relacionados ao crescimento microbiano,

biofilmes, esporos bacterianos, fatores de virulência e multirresistência (de Carvalho Leonel et al., 2019; Sueoka et al., 2018; Tan et al., 2018), constituindo uma abordagem promissora para erradicar bactérias patogênicas que causam principalmente doenças localizadas (Garcez et al., 2015).

O mecanismo fotodinâmico, consiste em um fotossensibilizador que é irradiado com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, absorvendo energia e passando para um estado excitado singlete ($^1S^*$). Este estado $^1S^*$ pode decair para o estado fundamental singlete (0S) com emissão de fluorescência, ou cruzar para um estado triplete excitado ($^3S^*$) por inversão espontânea do spin do elétron excitado. Uma vez formado o $^3S^*$, esta espécie pode participar em várias reações, decaindo ao estado 0S com emissão de fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. Na reação do tipo I, o $^3S^*$ pode reagir com um substrato orgânico ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por transferência de elétrons ou hidrogênio. No tipo II, o fotossensibilizador $^3S^*$ pode transferir energia para o oxigênio molecular, gerando 0S e oxigênio singlete (1O_2). Estes processos podem ocorrer simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do sensibilizador para o O_2 , do solvente e da concentração de O_2 (Bacellar et al., 2015; de Oliveira et al., 2014; Donnelly, McCarron Tunney, 2008; Lyon et al., 2011)

A TFD pode agir por três mecanismos principais de morte celular: morte celular apoptótica, necrótica e autofágica. Acredita-se que a localização do FS em diferentes organelas (mitocôndrias, lisossomas, retículo endoplasmático, membrana plasmática, entre outras) possa desempenhar um papel importante no tipo de mecanismo de morte celular, porém outros fatores também podem estar associados, como a concentração do FS e a dose de radiação luminosa. Em geral, aceita-se que a apoptose seja a principal modalidade de morte celular provocada pela TFD (Abrahamse, Hamblin, 2016).

Entre as vantagens da TFD, estão seu amplo espectro de ação, alta especificidade de alvo, poucos efeitos colaterais, e baixa possibilidade de induzir a resistência de patógenos (Dovigo et al., 2013). Tem sido descrito que algumas espécies de micro-organismos podem desenvolver mecanismos de resistência à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, como absorção reduzida ou alteração do fotossensibilizador causada por enzimas presentes na célula, bombas de efluxo,

bombeando o fotossensibilizador para fora da célula e enzimas neutralizantes de espécies oxidativas. Tais mecanismos foram atribuídos à origem celular e ao tipo de fotossensibilizador utilizado (Calzavara-Pinton et al., 2012; Casas et al., 2011).

Lasers e LEDs são as fontes de luz mais utilizadas na Terapia Fotodinâmica. O Laser é conhecido por sua monocromaticidade, coerência, colimação e polarização. Enquanto isso, o LED pode ser classificado como uma fonte de luz direcionada, pois a maior parte do fluxo de emissão de luz se concentra em uma única direção, evitando sua dispersão. O custo benefício e sua ampla faixa de espectro tornam o LED uma escolha frequente para a TFD (Awan, Tarin, 2006; Wilson, Patterson, 2008).

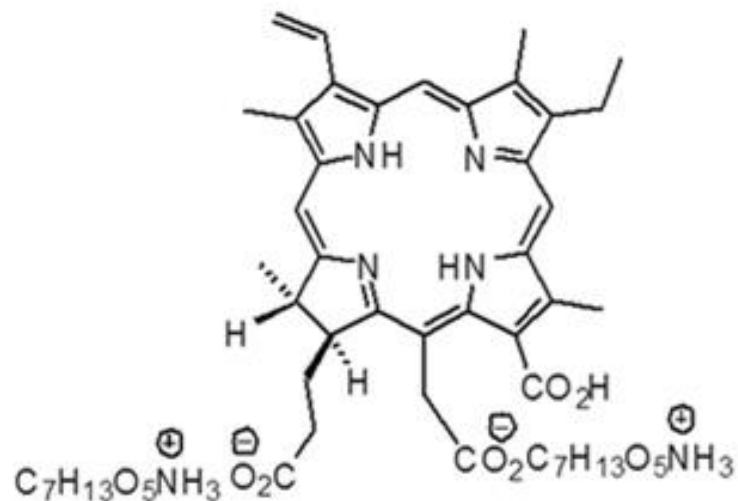
Existe uma ampla gama de FS disponíveis para realização da TFD, tornando-se necessário o estabelecimento de certas características para designar um fotossensibilizador adequado, como baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, características fotofísicas favoráveis, simplicidade na formulação, farmacocinética adequada, facilidade de manuseio, possibilidade de obtenção em escala industrial a custo reduzido, praticidade na análise dos componentes da fórmula, alta afinidade e penetração seletiva ao tecido doente em detrimento do tecido saudável (Ibanez Simplicio et al., 2002).

Os fotossensibilizadores derivados da Clorina e6 têm sido amplamente estudados para atuarem na TFD contra micro-organismos (Correa et al., 2012; Carmello et al., 2017; Dovigo et al., 2013; Quishida et al., 2015; Terra Garcia et al., 2018) por exigirem menor concentração de FS e menor período de iluminação, em relação aos outros fotossensibilizadores conhecidos como o Azul de Metileno, e bandas de absorção mais fortes nas regiões vermelhas (650-680nm) que penetram mais profundamente nos tecidos (Ferreira et al., 2008). Photodithazine® (PDZ) (Figura 1) é um fotossensibilizador derivado da Clorina e6, que foi modificado pela adição de N-metil-D-glicosamina como um agente solubilizante e estabilizante, tornando-a hidrossolúvel e facilitando sua difusão para o interior das células alvo (Ivanov et al., 2000).

Em relação a ação antimicrobiana, o PDZ demonstrou eficácia fotodinâmica contra *Candida* spp. *in vitro* (Dovigo et al., 2013) e *in vivo* (Carmello et al., 2017), além de agir contra biofilmes multiespécies (Quishida et al., 2015). Ainda, seu efeito foi avaliado em bactérias isoladas de bolsas periodontais de indivíduos com periodontite crônica, sendo observado 80% de redução dos micro-organismos

(Soukos, Goodson, 2011). Strakhovskaya et al. (2002) realizaram um estudo comparativo entre PDZ (2 μM) e a clorina e6 (2 μM) em sua forma natural sobre *Candida guilliermondii*, no qual o derivado da clorina e6 apresentou uma eficiência 25% maior que a Clorina e6 em sua forma natural. Esses autores sugeriram que os resultados mais promissores obtidos com o PDZ foram decorrentes da sua melhor solubilidade, e portanto, menor grau de agregação de moléculas em soluções aquosas.

Figura 1 - Estrutura molecular do Photodithazine® (PDZ)

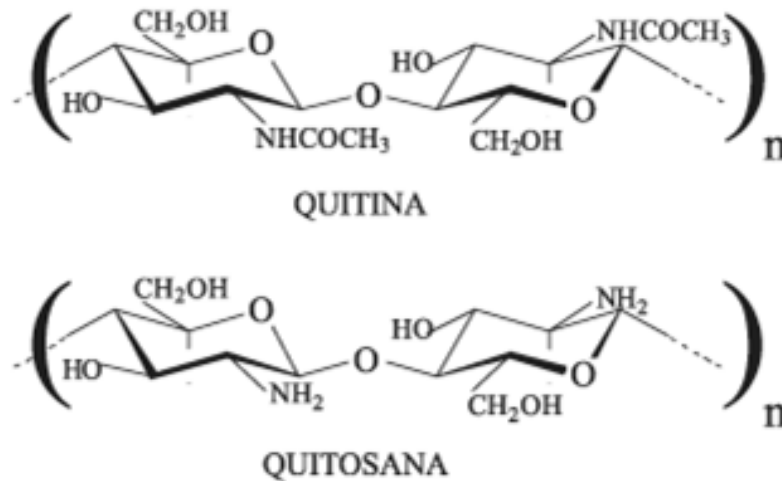


Fonte: Pires (2014).

Apesar da ampla eficácia apresentada pela TFD a partir de diversos FS, estudos recentes apontam a incorporação de polímeros naturais com intuito de potencializar os efeitos produzidos por essa técnica (Camacho-Alonso et al., 2017; Chen et al., 2012; Kim et al., 2013; Lee et al., 2011; Lee et al., 2013; Reza et al., 2011; Shrestha et al., 2012), como por exemplo, a quitosana. A quitosana (Figura 2) é um heteropolímero natural, derivado da quitina, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (Costa Silva et al., 2006). É proveniente da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer inúmeros graus de desacetilação, originando diversos derivados da quitosana. Nesse sentido, a quitosana não é uma entidade química uniforme, mas um grupo de polímeros parcialmente desacetilados. Quando os produtos obtidos apresentam grau de desacetilação entre 40 a 98% já podem ser caracterizados como quitosana

(Illum,1998). É conhecida por outros nomes, como poliglusam, quitina desacetilada e poli-d-glucosamina (Baldrick, 2010; Illum, 1998).

Figura 2 – Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana



Fonte: Battisti, Campana-Filho (2008).

A quitosana pode ser encontrada na parede celular de alguns fungos como *Mucorales*, porém é comumente obtida pela desacetilação parcial da quitina por hidrólise básica com solução de NaOH (Guibal et al., 1994; Wu et al., 2010). Apesar de quimicamente semelhantes, os diferentes graus de desacetilação, modificam as propriedades físico-químicas e biológicas entre a quitina e a quitosana. Essa diferença é facilmente observada na solubilidade desses produtos. Os grupos amina da quitosana são protonados (NH_3^+) em pH menor que seu pKa, que depende do grau de acetilação e da força iônica do meio (Hejazi, Amiji, 2003), conseqüentemente o polímero consegue ser solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos, como ácido acético e ácido fórmico. Essa solubilidade é dependente do percentual de desacetilação, se for baixo (40%) são solúveis até pH 9, já as de alto grau de desacetilação (85%) são solúveis apenas até pH 6,5 (Illum, 1998).

Diversas características da quitosana tem estimulado cada vez mais a pesquisa com esse biopolímero. Dentre elas, destaca-se a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, potencialidade antimicrobiana e baixo potencial alergênico (Costa Silva et al., 2006). Há décadas vem sendo extensamente investigada no campo biomédico, revelando sua atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias e vírus (Lozano-Navarro et al., 2017; Friedman et al., 2013;

Upadhyaya et al., 2013) sendo inclusive conhecida por exibir uma potente atividade antimicrobiana contra patógenos orais, como *Porphyronomas gingivalis* (Mooduto et al., 2019). Dentre as vantagens do uso da quitosana como agente antimicrobiano destaca-se o largo espectro de ação, forte atividade bactericida e bacteriostática e baixa citotoxicidade (Dutta et al., 2012; Costa et al., 2014).

Liu et al. (2004) sugeriram que a atividade antimicrobiana da quitosana pode estar relacionada com sua atuação nas membranas celulares dos micro-organismos. Com os resultados obtidos a partir de estudos em bactérias, esses autores concluíram que as soluções de quitosana aumentam a permeabilidade da membrana citoplasmática e da membrana externa da parede celular das bactérias. Esse dano provavelmente ocorre pelas interações eletroestáticas entre os grupamentos NH_3^+ da quitosana e os fosfolípidios das membranas celulares de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Liu et al., 2004).

Desse modo os efeitos da quitosana e seus derivados também tem sido testados na TFD como possíveis potencializadores de determinados FS, no tratamento de câncer (Reza et al., 2011; Lee et al., 2011; Lee et al., 2013; Kim et al., 2013) e no controle de bactérias, como *Enterococcus faecalis*, utilizando fotossensibilizadores como rosa bengala, azul de metileno e azul de toluidina (Camacho-Alonso et al., 2016; Shrestha et al., 2012). Além disso, Chien et al. (2013) demonstraram que a combinação de TFD e quitosana potencializa a ação antimicrobiana sobre células planctônicas e biofilme de *Candida albicans*.

Até o momento a capacidade da quitosana em potencializar a ação da terapia fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* foi analisada somente por Chen et al. (2012). Utilizando eritrosina como fotossensibilizador, células planctônicas e biofilmes de *S. mutans* foram submetidos à TFD, obtendo elevada ação antimicrobiana com a associação da quitosana à terapia, em comparação aos grupos tratados apenas com TFD (Chen et al., 2012). Esses dados confirmam que a quitosana pode potencializar a ação da TFD mediada por eritrosina e instiga o desenvolvimento de novos estudos com a utilização de outros fotossensibilizadores.

Além de verificar a ação da TFD sobre as células microbianas individuais, é necessário entender sua ação sobre os micro-organismos organizados em biofilmes. O biofilme é uma estrutura tridimensional formada por comunidades microbianas embebidas em uma matriz extracelular e aderidas à uma superfície sólida. A estrutura dos biofilmes fornece proteção aos micro-organismos contra agentes

antimicrobianos, alterações de pH e limitações de nutrientes por exemplo, tornando-os extremamente mais tolerantes e resistentes em relação à células planctônicas (Costa et al., 2013).

Os biofilmes dentários são formados por diferentes espécies bacterianas, que formam uma estrutura altamente complexa e organizada sobre os tecidos dentários. Mais de 700 espécies bacterianas já foram identificadas a partir de amostras do biofilme dentário e aproximadamente 40 espécies foram correlacionadas com cárie dentária (Salli, Ouwehand 2015). Além de *S. mutans*, outros micro-organismos acidogênicos e acidúricos que compõem o biofilme podem apresentar papel importante na cárie dentária, como *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Veillonella spp.*, *Actinomyces spp.* e *Candida spp.*, sendo metabolicamente ativos em exposições frequentes de açúcar, produzindo ácidos que podem levar à desmineralização dos tecidos dentários (Pires et al., 2019).

Portanto, estudos *in vitro* de agentes antimicrobianos, como a terapia fotodinâmica, contra o biofilme dentário não devem ser limitados à testes em biofilmes formados por uma única espécie microbiana. Uma alternativa à esses modelos de estudo são os modelos de microcosmos, que representam com maior fidelidade a diversidade microbiológica da cavidade bucal (Filoche et al., 2007). Biofilmes microcosmos consistem em um conjunto de micro-organismos da microbiota oral natural, formados a partir de amostras provenientes da cavidade bucal, como a saliva, que podem ser coletadas de um único ou múltiplos doadores (Chevalier et al., 2018). Assim, os biofilmes microcosmos são capazes de reproduzir, em laboratório, a biodiversidade, relações ecológicas, estrutura heterogênea e condições de pH dos biofilmes dentários da cavidade bucal humana (Méndez et al., 2018). Segundo Pires et al. 2019, 60% das espécies do inoculo original, proveniente das amostras dos doadores, são preservadas nos biofilmes microcosmos.

Além disso, os biofilmes microcosmos permitem explorar as variações da microbiota oral entre os indivíduos. Por meio de coletas de múltiplos doadores em diferentes períodos, é possível considerar nos estudos de antimicrobianos os fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a microbiota, como, consumo de tabaco, dieta e higiene (Junior, Izabel 2019; Kim et al., 2018). Em certa variedade de estudos, o inoculo escolhido para os experimentos de biofilmes microcosmos tem sido a saliva, derivada de um único ou de diferentes doadores (Azevedo et al., 2011; Van de Sande et al., 2011; Rudney et al., 2012). De acordo com Filoche et al.

(2007), esse modelo demonstra o dinamismo da comunidade microbiológica, sua composição cariogênica e alterações de pH. Por meio do “Human Oral Microbial Identification Microarray” (HOMIM), foi verificado que o modelo estabelecido de microcosmos orais originados a partir de inóculo salivar é reprodutível e representa adequadamente a microbiota oral (Rudney et al., 2012).

Em síntese, a TFD apresenta eficácia em reduzir micro-organismos patogênicos na cavidade oral, com grande potencial terapêutico para doenças infecciosas, como a cárie dentária (Panhóca, 2011; Lara et al., 2019). Assim, a proposta desse estudo foi avaliar a associação da quitosana à terapia fotodinâmica contra *Streptococcus mutans* e biofilmes microcosmos orais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a quitosana como um possível potencializador da Terapia Fotodinâmica (TFD), mediada pelo fotossensibilizador Photodithazine®, no controle de *Streptococcus mutans* e biofilmes microcosmos orais.

2.2 Objetivos específicos

- a) Testar a sensibilidade das células planctônicas de *S. mutans* à TFD mediada por Photodithazine®, quando associados à quitosana;
- b) Verificar os efeitos da quitosana na capacidade das células de *S. mutans* em absorver o fotossensibilizador Photodithazine®;
- c) Avaliar os efeitos da associação da quitosana com Photodithazine® na terapia fotodinâmica contra biofilmes de *S. mutans* formados sobre a superfície do esmalte dentário, analisando o número de células viáveis e a estrutura morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- d) Estudar os efeitos da terapia fotodinâmica com Photodithazine® associada à quitosana sobre biofilmes microcosmos formados a partir de saliva, analisando a contagem do número de células viáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ativação da cepa padrão de *S. mutans*

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* UA 159, mantida em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para a ativação desse microorganismo, a cepa foi cultivada em ágar Infusão Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) e mantida em estufa por 48 h a 37°C em 5% de CO₂.

3.2 Fotossensibilizador e Fonte de Luz

O fotossensibilizador Photodithazine® foi fornecido pela Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino, docente e pesquisadora da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. É apresentado comercialmente na concentração de 5 mg/mL e foi esterilizado por meio de filtro com poros de diâmetro de 0,22 µm. O fotossensibilizador foi armazenado no escuro em geladeira. A fonte de luz (L) utilizada nos experimentos de TFD sobre *S. mutans* foi o Laser (Photon Lase III, DMC, São Carlos/ SP, Brasil) no comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível) na densidade de energia de 15 J/cm² e irradiância de 50 mW/cm² por 300 s (Figura 4). A concentração do PDZ (0,3 mg/mL e 0,6 mg/mL) e a energia do laser utilizada, foram selecionados de acordo com estudos prévios de Terra Garcia et al. (2018). A fonte de luz para os experimentos com biofilmes microcosmos foi o LED (Biopdi, Irrad-Led, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível) na densidade de energia de 15 J/cm² e irradiância de 42,8 mW/cm² por 357 segundos. Os parâmetros foram selecionados de acordo com estudo piloto desenvolvido previamente.

3.3 Preparo da solução de quitosana

A quitosana utilizada nesse trabalho foi obtida a partir da desacetilação da quitina extraída de cascas de camarão e foi fornecida pela Profa. Dra. Vânia Maria Maciel do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETECH) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A solução de quitosana foi preparada de acordo com estudos de Costa et al. (2006), onde 1 g de quitosana em flocos (grau de desacetilação 86,5%) foi dissolvido em 200 mL de solução de ácido acético a 1% e deixado sob agitação em agitador magnético por 2 horas. O pH da solução foi ajustado à 6,5 (Illum, 1998; Hyppólito, 2014), utilizando-se NaOH 1 Molar em constante agitação. Posteriormente a solução de quitosana foi esterilizada em autoclave a 110°C por 10 minutos.

3.4 Ação da terapia fotodinâmica sobre *S. mutans* em culturas planctônicas

3.4.1 Preparo da suspensão padronizada de *S. mutans*

A cepa foi incubada em caldo BHI em estufa a 37°C por 48 h em 5% de CO₂. Após este período, as células microbianas foram centrifugadas a 1300 xg durante 10 min, o sobrenadante de cada grupo foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 398 nm e densidade óptica de 0,620, obtendo-se uma concentração de 10⁶ células/mL de *S. mutans*.

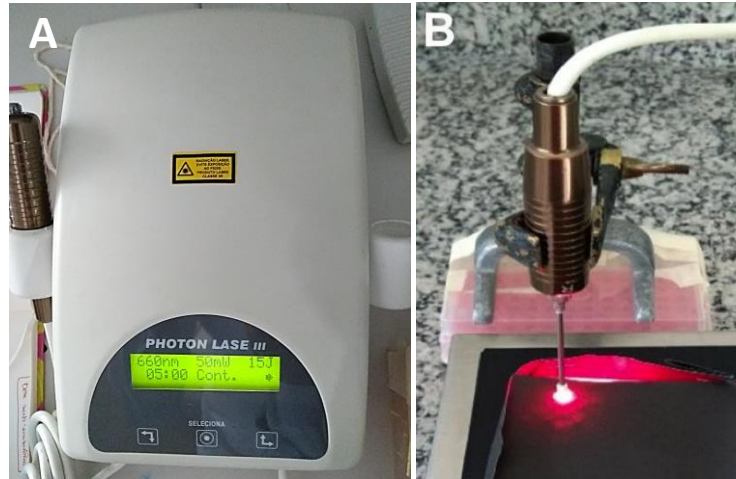
3.4.2 Teste de sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana

A fotossensibilização sobre as culturas planctônicas de *S. mutans* foi realizada em placas de 96 poços. Uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana, previamente padronizada em 10⁶ células/mL foi adicionada em cada poço da placa. Os ensaios foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=3):

- a) Grupo controle sem tratamento (F-L-);
- b) Aplicação apenas do Laser (F-L+);
- c) PDZ e irradiação (PDZ+L+);
- d) Aplicação somente de PDZ (PDZ+L-);
- e) Quitosana e irradiação (QT+L+);
- f) Somente Quitosana (QT+L-);
- g) PDZ com adição de quitosana e irradiação (PDZ+QT+L+);
- h) PDZ com adição de quitosana (PDZ+QT+L-).

De acordo com as condições experimentais descritas acima, foram adicionados 100 µL de PDZ, 100 µL de quitosana ou 100 µL de PBS para os grupos sem fotossensibilizador, resultando na concentração final de 0,3 mg/mL de fotossensibilizador nos poços. As placas foram protegidas para evitar a irradiação de luz do ambiente e foram levadas para agitador orbital (Solab Piracicaba, Brasil) durante 15 min (tempo de pré-irradiação). Todo o experimento foi realizado no escuro, com a fibra óptica posicionada na parte superior da placa, com o auxílio de um anteparo negro fosco para evitar espalhamento da luz (Figura 3).

Figura 3 - Aplicação de laser sobre culturas planctônicas de *S. mutans* em placa de 96 poços



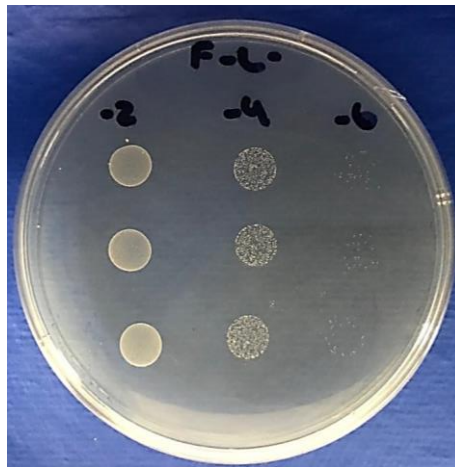
Legenda: A - Aparelho de Laser nas configurações utilizadas para TFD em culturas planctônicas de *S. mutans*; B - Aplicação do Laser com anteparo fosco somente com espaço para irradiação da suspensão de *S. mutans* no poço.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.3 Determinação do número de UFC/mL

Após irradiação, foram preparadas diluições seriadas (10^2 ; 10^4 ; 10^6) e 10 μ L de cada diluição foram semeados em placas de ágar BHI utilizando a técnica da gota (Figura 4). Após período de incubação de 48 h a 37°C em 5% de CO₂ foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Figura 4 - Representação da placa de ágar BHI semeada pela técnica da gota



Legenda: Diluições semeadas em placa de ágar BHI por meio da técnica da gota, após incubação por 48 h a 37°C em 5% de CO₂.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Ação da terapia fotodinâmica sobre biofilme de *S. mutans* formados em esmalte bovino

3.5.1 Confeção dos corpos-de-prova de dente bovino

Os corpos-de-prova (Figura 5d) foram confeccionados de acordo com a metodologia de Terra Garcia et al. (2018) sendo preparados a partir da parte central de dentes incisivos bovinos e medindo 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Inicialmente foi seccionada a raiz da coroa dos dentes (Figura 5a) com o auxílio de uma peça reta odontológica com disco diamantado. As coroas foram então fixadas em um suporte da máquina para corte de amostras circulares (Figura 5b) com a face vestibular voltada para cima. Os cortes foram realizados com uma broca trefina de 4 mm internos (Figura 5c).

Cada corpo-de-prova foi inserido no interior de uma matriz metálica, com dimensões de 4 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade (Figura 6a), para polimento e padronização (Figura 6b), sendo verificado por paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A superfície da dentina

ficou voltada para o exterior da matriz sendo então desgastada com lixa de granulação 120 (Fepa-P, Extec, Enfield, CT, USA) em poltriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica AS, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração a água e baixa velocidade.

A seguir, os corpos-de-prova foram armazenados em 0,1% (v/v) de solução de timol a 4°C. Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório Integrado de Pesquisa em Odontologia Restauradora (LIPq) do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia no Campus de São José dos Campos-Unesp.

Figura 5 - Imagem ilustrativa do corte dos corpos-de-prova de dentes bovinos

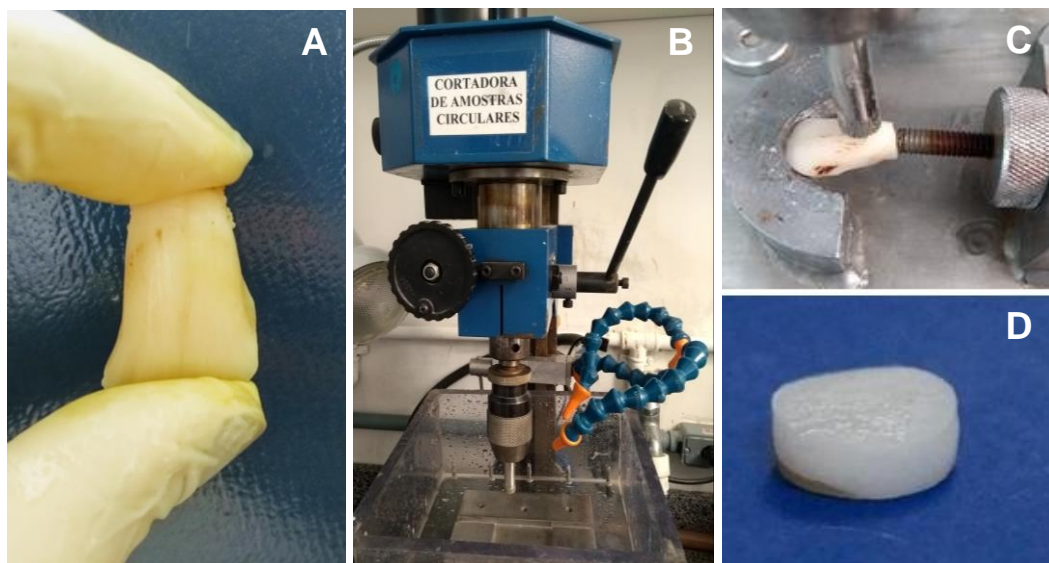
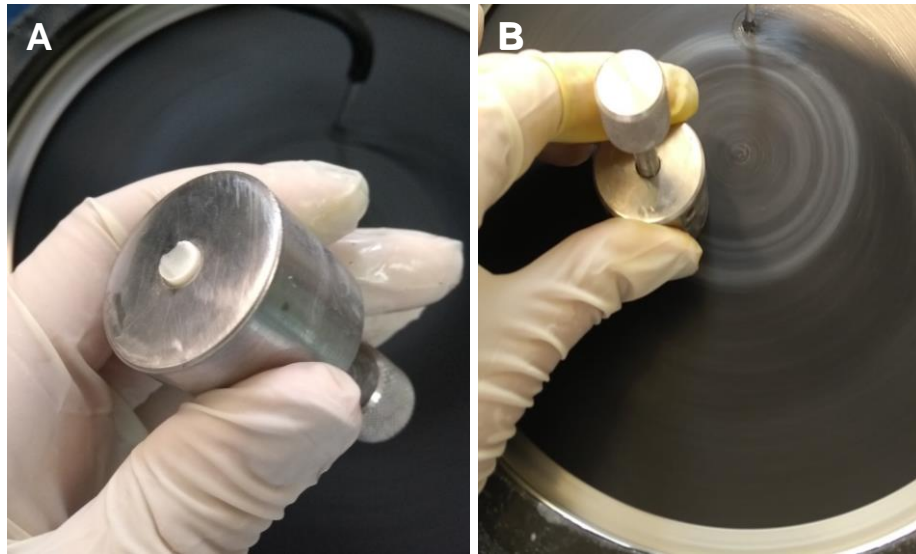


Figura: A - Parte central do dente bovino utilizado para confecção do corpo-de-prova. B - Máquina de amostras circulares. C - Dente em posição para o corte da coroa. D - Corpo-de-prova seccionado obtido a partir de dentes bovinos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Polimento dos corpos-de-prova de dente bovino



Legenda: A - Matriz metálica com dimensão de 4 mm de diâmetro. B - Polimento do corpo-de-prova utilizando politriz circular.

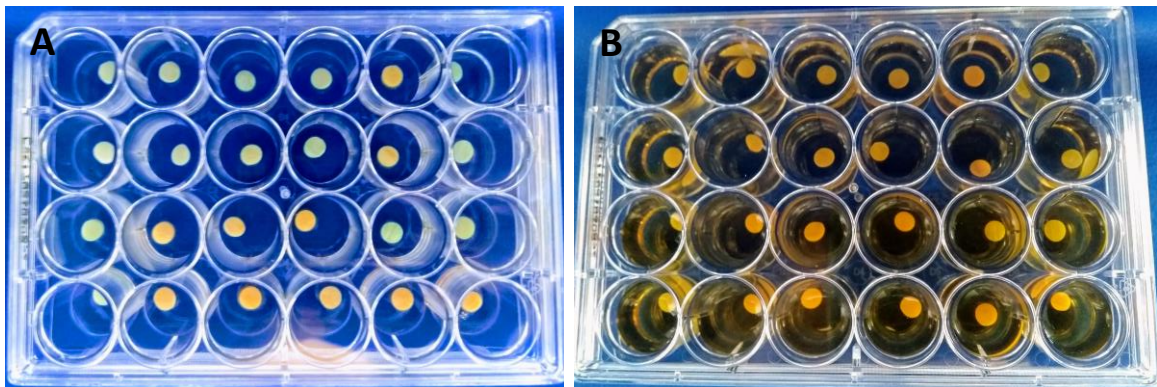
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.2 Formação do biofilme de *S. mutans* sobre os corpos-de-prova de dentes bovinos

Com os corpos-de-prova devidamente posicionados no fundo de placas de 24 poços (Figura 7a), foi acrescentado em cada poço 2 mL de caldo BHI enriquecido com 5% de sacarose e adicionado 225 μL da suspensão padronizada à 10^8 células/mL de *S. mutans* (Figura 7b). A seguir as placas foram incubadas em 5% de CO_2 a 37°C por 24 h.

Após período de incubação, os poços foram lavados três vezes com 2 mL de PBS, para a remoção das células fracamente aderidas, e posteriormente foi adicionado 2 mL de caldo BHI enriquecido com 5% de sacarose. As placas foram incubadas novamente em 5% de CO_2 a 37°C por mais 24 h.

Figura 7 - Corpos-de-prova posicionados no fundo de placas de 24 poços



Legenda: A - Corpos-de-prova posicionados no fundo de placas de 24 poços. B - Adição de Caldo BHI com 5% de sacarose e suspensão de *S. mutans* padronizado em 10^8 células/ml sobre os corpos-de-prova para formação de biofilme.

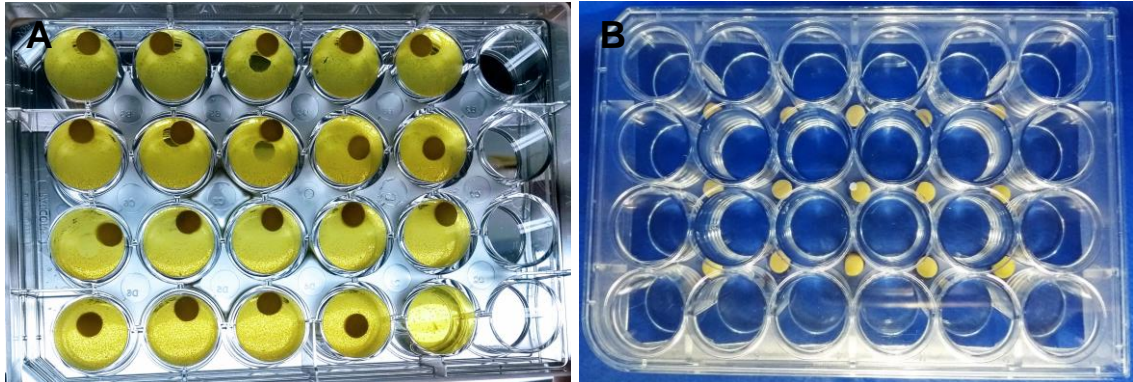
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.3 Teste de sensibilidade à terapia Fotodinâmica antimicrobiana sobre biofilme de *S. mutans*

Após a formação dos biofilmes os corpos-de-prova (Figura 8a) foram posicionados nas interseções dos poços da placa de 24 poços (Figura 8b) para que fosse possível o uso de um volume mínimo de fotossensibilizador. Assim, foi adicionado 200 μ L de PDZ ou PBS, e 100 μ L de quitosana, conforme o grupo experimental. O PDZ foi utilizado na concentração de 0,6 mg/mL. As placas foram então envolvidas em papel alumínio para evitar a irradiação de luz ambiente, e posicionadas no agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) durante 15 min para o tempo de pré-irradiação.

Em seguida, as placas com os grupos F-L+; PDZ+L+; QT+L+; PDZ+QT+L+, foram irradiados com laser na densidade de energia de 15 J/cm² por 5 min. Já as placas com os grupos F-L-; PDZ+L-; QT+L-; PDZ+QT+L-, foram mantidos em papel alumínio para posterior análise.

Figura 8 - Posição dos corpos-de-prova nos poços das placas de 24 poços após formação de biofilme para aplicação do fotossensibilizador e quitosana



Legenda: A - Formação de biofilmes de *S. mutans* sobre corpos-de-prova em fundo de placa de 24 poços. B - Corpos-de-prova posicionados nas intersecções dos poços da placa de 24 poços para aplicação do fotossensibilizador e quitosana.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.4 Análise dos efeitos da TFD sobre os biofilmes de *S. mutans* por meio da determinação do número de células viáveis (UFC/mL)

Após irradiação, cada corpo-de-prova foi transferido para tubos Falcon contendo 4 mL de PBS e os biofilmes aderidos aos corpos-de-prova foram removidos utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonopuls HD2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 s para romper os agregados microbianos.

A partir da solução obtida, foram realizadas diluições seriadas da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 10 μ L foram semeadas, utilizando a técnica da gota, em placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas durante 48h a 37°C em 5% de CO₂. Após incubação, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

3.5.5 Análise dos efeitos da TFD sobre os biofilmes de *S. mutans* por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os corpos-de-prova com o biofilme formado e tratado foram transferidas para as placas de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora. A seguir os corpos-de-prova foram desidratados com 1 mL de soluções crescentes de etanol (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 minutos, seguidos de imersão em etanol a 100% por 1 h. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h para secagem completa dos corpos-de-prova.

Após a secagem, os corpos-de-prova foram transferidos para *stubs* de alumínio e cobertos com ouro por 160 s a 40 mA (Denton Vacuum Desk II, Moorestown, NJ, EUA). Assim, os corpos-de-prova, contendo os biofilmes formados e tratados com TFD, foram examinados e fotografados por microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-5600, Inc., Peabody, MA, EUA) no Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP.

3.6 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de *S. mutans*

Essa análise foi realizada seguindo a metodologia proposta por George e Kishen (2007) com algumas modificações. A cepa de *S. mutans* foi cultivada em caldo BHI e mantida em estufa por 48 h a 37°C em 5% de CO₂. As células foram recolhidas por centrifugação de 1300 xg durante 10 min e foram lavadas com água destilada. A densidade óptica da cultura foi ajustada em 10⁸ células/mL.

Após a padronização, 1 mL de suspensão foi colocado em tubo Falcon contendo 1 mL de fotossensibilizador ou água destilada ou quitosana, de acordo com o grupo experimental (Água destilada; Quitosana; PDZ 0,6 mg/mL). Os tubos foram incubados em estufa a 37°C durante 30 min em incubadora orbital a 120 rpm.

Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada e lisadas por tratamento com 1 mL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) a 2% durante 16 h. A intensidade de absorbância da solução do sobrenadante após a centrifugação (1300 xg) durante 10 min foi registrada em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 398 nm (B582, Micronal, São Paulo, Brasil).

3.7 Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica com quitosana sobre biofilmes microcosmos orais

3.7.1 Comitê de ética

Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/Unesp do Campus de São José dos Campos sob o parecer nº 3.842.567.

3.7.2 Seleção dos voluntários e coleta de material

Para a formação dos biofilmes microcosmos, foram selecionados 6 pacientes em atendimento na Clínica de Odontologia Restauradora do ICT/Unesp. O critério de inclusão foi: pacientes com idade entre 20 a 40 anos. O critério de exclusão foi: o uso de antibióticos nos últimos 90 dias precedentes

A saliva, estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, IL, EUA), foi coletada e armazenada em frascos estéreis totalizando aproximadamente 20 mL por amostra. As amostras foram transportadas em gelo para o laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT/Unesp onde foram transferidas para caldo BHI com 20% de glicerol e armazenados em freezer -80°C.

3.7.3 Formação dos biofilmes microcosmos

Para formação do biofilme microcosmo foi seguida a metodologia de Méndez et al. (2018) com algumas modificações. As amostras do material de saliva em caldo BHI foram descongeladas e homogeneizadas. Então, 200 µL foi adicionado em 10 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose e levados para estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 48 h.

Os corpos-de-prova de esmalte bovino foram autoclavados e posicionados no fundo de placas de 24 poços. Com os corpos-de-prova devidamente posicionados, foi acrescentado 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose. A seguir, foram adicionados 225 µL da suspensão microbiana e as placas foram incubadas a 37°C por 120 h em 5% de CO₂. A cada 24 h os poços foram lavados três vezes com 2 mL de PBS para remoção das células fracamente aderidas e posteriormente foram adicionados mais 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose. As placas então foram incubadas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ novamente.

3.7.4 Fotossensibilização *in vitro*

Após a formação do biofilme, os corpos-de-prova foram posicionados na intersecção dos poços da placa de 24 poços. Assim, foram adicionados 200 µL de Photodithazine (PDZ); 100 µL de quitosana ou PBS conforme o grupo experimental. O PDZ foi utilizado na concentração de 0,6 mg/mL. As placas foram protegidas da luz, para evitar a irradiação de luz do ambiente, e colocadas no agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) durante 15 min (tempo de pré-irradiação). Em seguida os grupos F-L+; QT+L+; PDZ+L+ e PDZ+QT+L+ foram irradiados com LED na densidade de energia de 15 J/cm² por 357 segundos. Já os grupos F-L-; QT+L-; PDZ+L- e PDZ+QT+L- continuaram protegidos da luz pelo mesmo tempo em que os biofilmes foram submetidos à irradiação.

3.7.5 Contagem de UFC/mL

Os corpos-de-prova logo após a fotossensibilização *in vitro* foram transferidos para tubos Falcon contendo 4 mL de PBS. Os biofilmes aderidos foram desprendidos utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 s, rompendo os agregados microbianos. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições seriadas da suspensão do biofilme.

Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas em placas contendo meios de cultura específicos: BHI para contagem total de micro-organismos totais e 10 µL de cada diluição foram semeados em placas contendo ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose para contagem de estreptococos do grupo *mutans*. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h à 5% de CO₂ para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.8 Análise dos resultados obtidos

Os resultados de UFC/mL foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism 6.0, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *S. mutans* por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Nos ensaios de TFD sobre *S. mutans* em culturas planctônicas (Figura 9), o PDZ teve efeito inibitório após a irradiação, com uma diminuição de 2 log de UFC/mL para o grupo PDZ+L+, em relação ao grupo controle (F-L-). Quando a quitosana foi incorporada ao tratamento, o grupo PDZ+QT+L+ apresentou uma redução de 2,5 log de UFC/mL, quando comparado ao grupo sem adição de quitosana (PDZ+L+) e 4,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle (F-L-).

Quando as células foram tratadas apenas com o fotossensibilizador, em ausência de luz, verificou-se que não houve redução do número de *S. mutans* em relação ao grupo controle (F-L-). Entretanto, com a associação da quitosana (PDZ+QT+L-) ocorreu uma redução celular de 2,5 log de UFC/mL, tanto em relação aos grupos com ausência de quitosana (PDZ+L-) como em relação ao grupo controle (F-L-).

Os grupos tratados apenas com quitosana, tanto na presença como na ausência de luz (QT+L-; QT+L+), não apresentaram redução celular significativa quando comparados entre si. Porém em relação ao grupo controle (F-L-) obteve-se uma pequena redução de 0,5 log de UFC/mL.

Figura 9 - Dados de UFC/mL de *S. mutans* obtidos no teste em culturas planctônicas com terapia fotodinâmica associada à quitosana

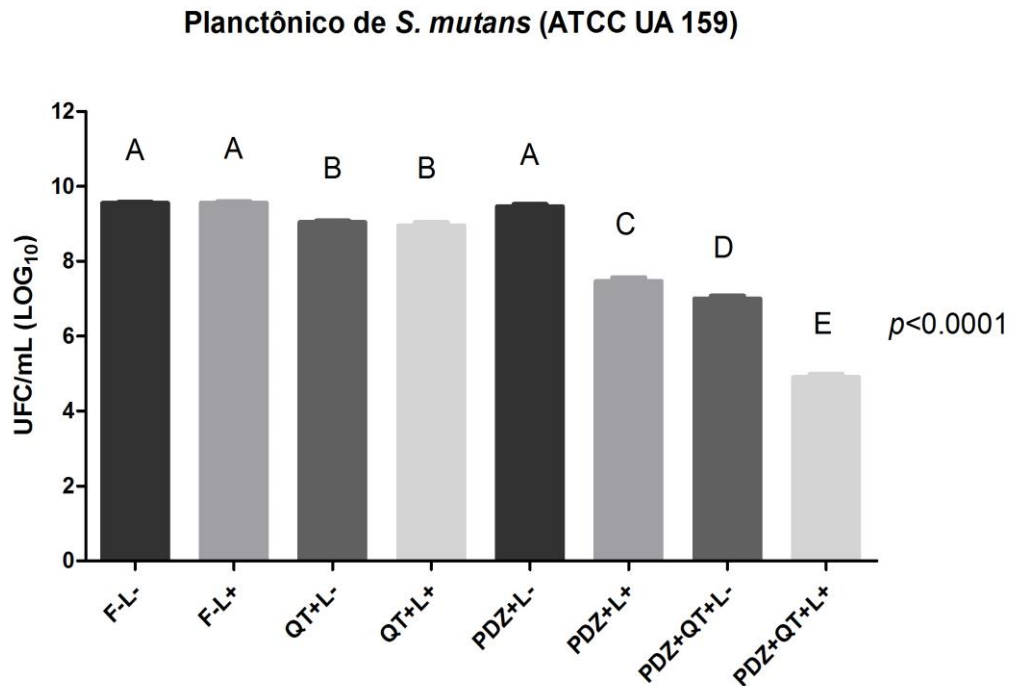


Figura 9: Grupo controle (F-L-); Grupo somente luz (F-L+); Grupo Quitosana sem luz (QT+L-); Grupo Quitosana com luz (QT+L+); Grupo PDZ (PDZ+L-); Grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); Grupo PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L-); Grupo TFD com PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ação da Terapia Fotodinâmica em biofilmes de *S. mutans* por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Os resultados da ação da TFD em biofilmes de *S. mutans* sobre corpos-de-prova de dente bovino (Figura 10) demonstraram que *S. mutans* foram capazes de formar grandes quantidades de biofilme na superfície do esmalte dos dentes bovinos, com formação de aproximadamente 10 log de UFC/mL no grupo controle, sem tratamento (F-L-). O tratamento somente com laser (F-L+) não reduziu o número de células viáveis de *S. mutans*, indicando não apresentar ação antimicrobiana.

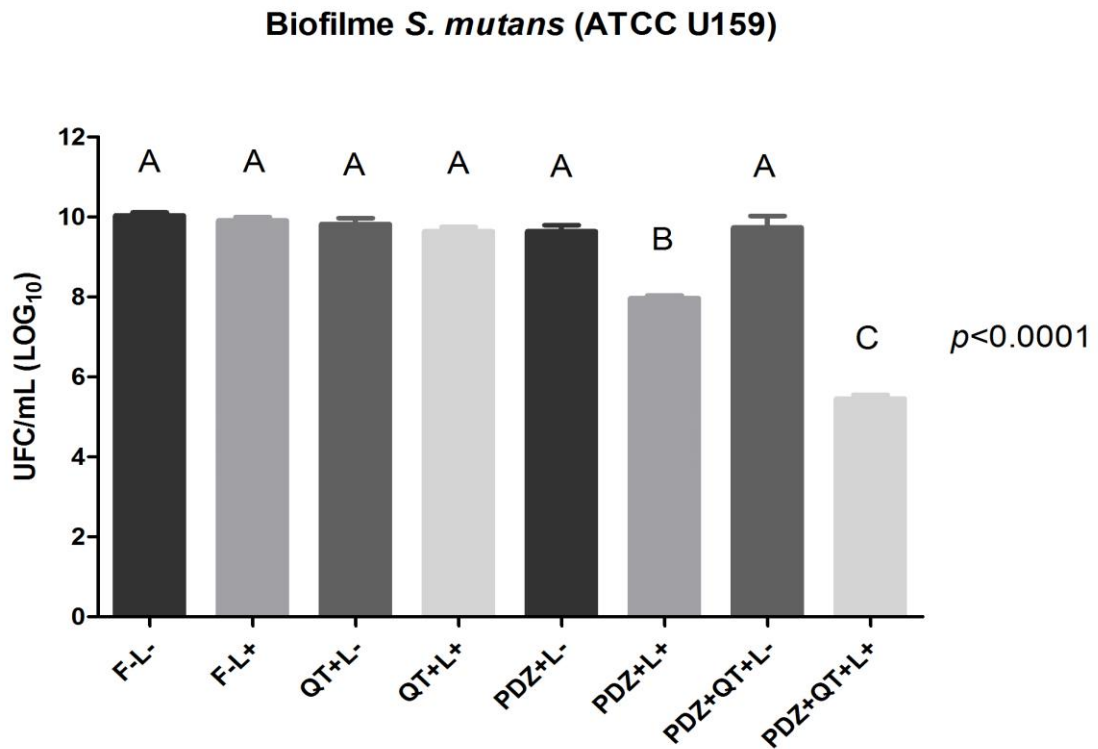
Quando os biofilmes foram tratados apenas com o fotossensibilizador na ausência de luz (PDZ+L-) verificou-se também que não houve redução do número de *S. mutans* em relação ao grupo controle (F-L-), até mesmo no grupo com adição da solução de quitosana (PDZ+QT+L-).

Em relação aos grupos tratados com terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador utilizado levou a uma redução significativa no número de *S. mutans*, com diferença estatística significante entre os grupos PDZ+L- e PDZ+L+, onde o valor de p foi sempre inferior a 0.0001. Quando comparado ao grupo controle (F-L-) o grupo PDZ+L+ possuiu uma redução de aproximadamente 2 log de UFC/mL do biofilme de *S. mutans*.

Quando a quitosana foi adicionada ao tratamento, a redução celular foi ainda mais evidenciada. O grupo PDZ+QT+L+ apresentou cerca de 2,5 log de UFC/mL de redução em relação ao grupo sem adição de quitosana (PDZ+L+) e cerca de 4,5 log de UFC/mL em relação grupo controle (F-L-)

Os grupos tratados apenas com quitosana, tanto na presença como na ausência de luz (QT+L-; QT+L+), não apresentaram redução celular significativa quando comparados entre si ou em relação ao grupo controle (F-L-).

Figura 10 - Dados de UFC/mL de *S. mutans* obtidos no teste em biofilmes com Photodithazine e quitosana



Legenda: Grupo controle (F-L-); Grupo somente luz (F-L+); Grupo quitosana sem luz (QT+L-); Grupo quitosana com luz (QT+L+); Grupo PDZ (PDZ+L-); Grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); Grupo PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L-); Grupo TFD com PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

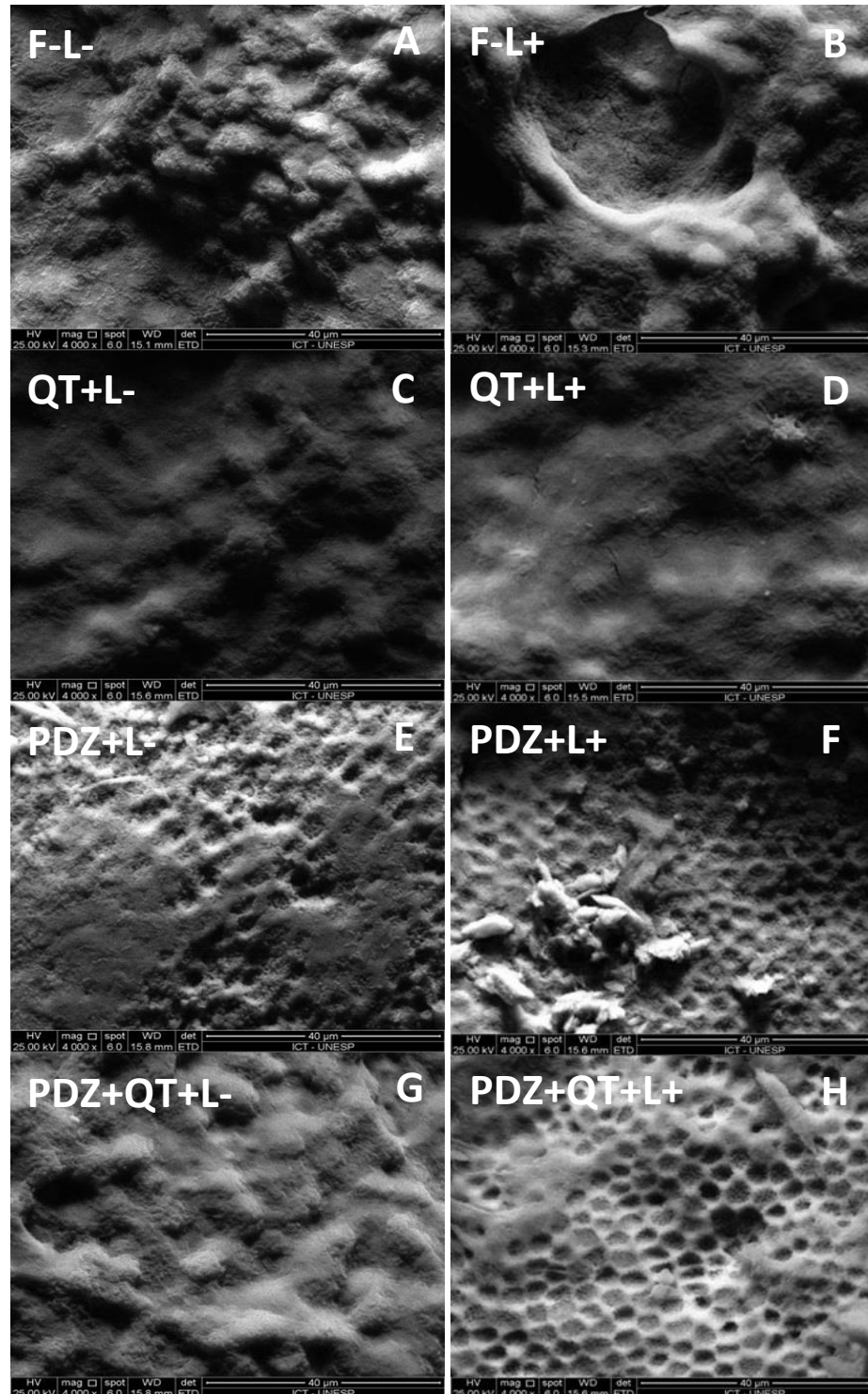
4.3 Análise da ação da terapia fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 11) os grupos F-L-; F-L+; QT+L-; QT+L+; PDZ+L- e PDZ+QT+L-, apresentaram biofilmes formados por uma densa massa constituída de matriz extracelular. Em contra partida, o grupo tratado com terapia fotodinâmica utilizando o PDZ sem associação de quitosana (PDZ+L+) demonstrou redução na massa de biofilme com menor quantidade de aglomerados de células. Essa redução do biofilme provocada pela ação da TFD se tornou ainda mais evidente no grupo com adição de quitosana ao tratamento (PDZ+QT+L+),

sendo possível visualizar células planctônicas e a superfície do corpo-de-prova evidenciando o esmalte dentário.

Assim, observa-se que as imagens obtidas em MEV coincidem com os resultados obtidos na contagem de unidades formadoras de colônias confirmando que a quitosana pode potencializar a ação da TFD mediada por PDZ, sendo capaz de desestruturar os biofilmes e reduzir o número de células de *Streptococcus mutans*.

Figura 11 - MEV da superfície do esmalte de dentes bovinos com biofilme de *S. mutans*



Legenda: As imagens possuem aumento de 4.0 kx. A - grupo controle (F-L-); B - grupo somente irradiação (F-L+); C - grupo quitosana (QT+L-); D - grupo quitosana com irradiação (QT+L+); E - grupo somente PDZ (PDZ+L-); F - grupo TFD (PDZ+L+); G - grupo PDZ com adição de quitosana (PDZ+QT+L-); H - grupo TFD com quitosana (PDZ+QT+L+).

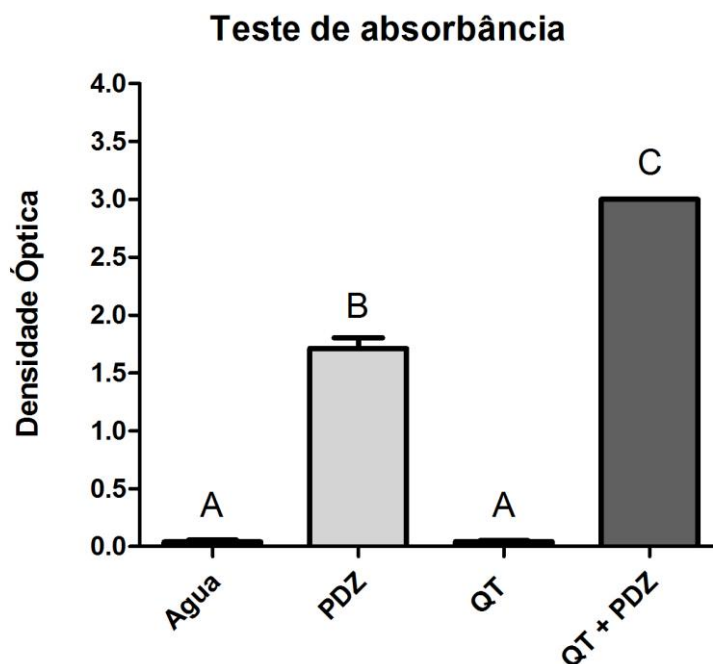
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de *S. mutans*

Os resultados dos testes de absorção do fotossensibilizador e quitosana (Figura 12) demonstraram que as células de *S. mutans*, foram capazes de absorver o fotossensibilizador estudado (PDZ). O grupo tratado com o fotossensibilizador PDZ apresentou uma DO superior ao grupo controle sem fotossensibilizador (tratado apenas com água) de aproximadamente 1,5, indicando que o PDZ possui capacidade em penetrar nas células de *S. mutans*

Quando o PDZ foi colocado em contato com a quitosana (PDZ+QT), a DO obtida foi igual a 3,0 sugerindo que a solução de quitosana aumentou a absorção do FS pelas células de *S. mutans* (Figura 12). Além disso o grupo tratado com solução de quitosana na ausência de PDZ apresentou uma DO semelhante ao grupo controle, demonstrando que não foi capaz de penetrar nas células bacterianas.

Figura 12 - Valores de Densidade Óptica dos testes de absorbância dos fotossensibilizadores e quitosana pelas células de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (Água); Grupo somente PDZ (PDZ); Grupo somente Quitosana (QT); Grupo PDZ mais quitosana (QT+PDZ).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Ação da terapia fotodinâmica em biofilmes microcosmos orais por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Os ensaios de TFD em biofilmes microcosmos orais sobre corpos-de-prova de dentes bovinos (Figura 13 e 14) demonstraram que o microbioma formado a partir de inóculo salivar foi capaz de formar grandes quantidades de biofilme. A análise total de micro-organismos crescidos sobre ágar BHI possuiu formação de aproximadamente 5 log de UFC/mL no grupo controle, sem tratamento (F-L-) e a contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS apresentou crescimento de aproximadamente 7,5 log de UFC/mL no mesmo grupo. A irradiação com LED (F-L+) não foi capaz de reduzir o número de células viáveis, demonstrando que a fonte de luz utilizada não possui ação inibitória.

Quando os biofilmes foram tratados apenas com o fotossensibilizador (PDZ+L-) verificou-se também que não houve redução no número de micro-organismos totais (Figura 13) e de estreptococos do grupo *mutans* (Figura 14) em relação ao grupo controle (F-L-). Entretanto, com adição da solução de quitosana à terapia fotodinâmica, observamos que o grupo PDZ+QT+L- foi capaz de reduzir a contagem de micro-organismos totais presentes no biofilme em aproximadamente 0,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle (Figura 13). Ainda, sobre os estreptococos do grupo *mutans* somente a ação do PDZ associado a quitosana (PDZ+QT+L-) reduziu aproximadamente 0,3 log de UFC/mL em relação ao grupo controle (Figura 14).

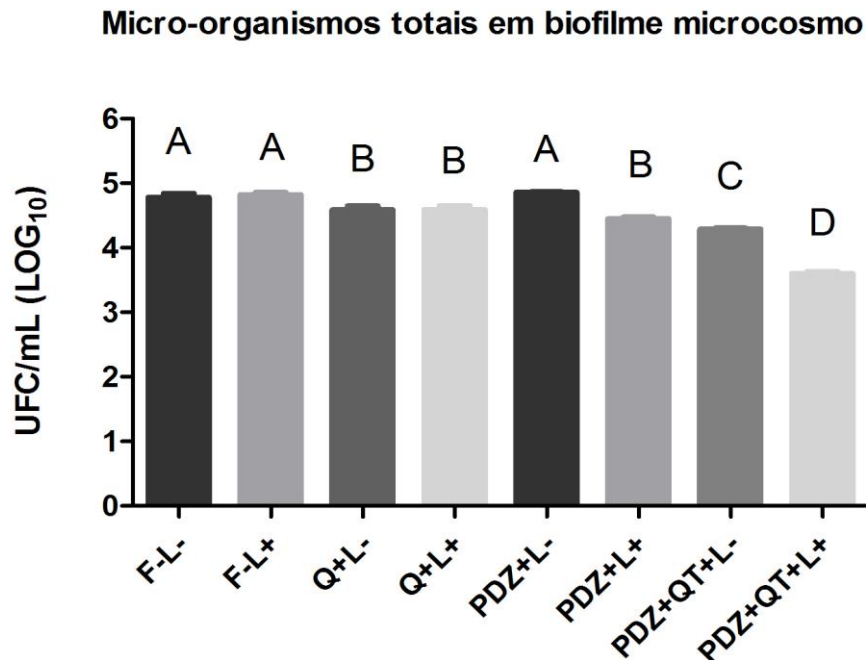
Em relação aos grupos tratados com terapia fotodinâmica, houve redução significativa de estreptococos do grupo *mutans* isolados a partir do biofilme microcosmos, com diferença estatística significativa entre os grupos PDZ+L- e PDZ+L+ (Figura 14). Comparado ao grupo controle (F-L-), o grupo PDZ+L+ reduziu aproximadamente 1,5 log de UFC/mL na contagem de células viáveis. Quando a quitosana foi adicionada ao tratamento, a redução foi ainda mais evidenciada. O grupo PDZ+QT+L+ apresentou cerca de 1,5 log de UFC/mL de redução em relação ao grupo sem adição de quitosana (PDZ+L+) e cerca de 2,7 log de UFC/mL em relação grupo controle (F-L-) (Figura 14).

De maneira semelhante, foi verificada a ação da terapia fotodinâmica associada à quitosana sobre o crescimento total de micro-organismos que formam o

biofilme microcosmo. De forma que, o grupo PDZ+QT+L+ reduziu aproximadamente 1 log de UFC/mL na contagem de células viáveis em relação ao grupo PDZ+L+ e aproximadamente 1,5 log de UFC/mL quando comparado ao grupo controle (Figura 12).

Os grupos tratados apenas com quitosana, tanto na presença como na ausência de luz (QT+L-; QT+L+), não apresentaram redução celular significativa quando comparados entre si ou em relação ao grupo controle na contagem de estreptococos do grupo *mutans* (Figura 14). Entretanto, a contagem de micro-organismos totais apresentou redução de aproximadamente 0,3 log de UFC/mL nos mesmos grupos em relação ao grupo controle (Figura 13), demonstrando que a quitosana teve ação inibitória.

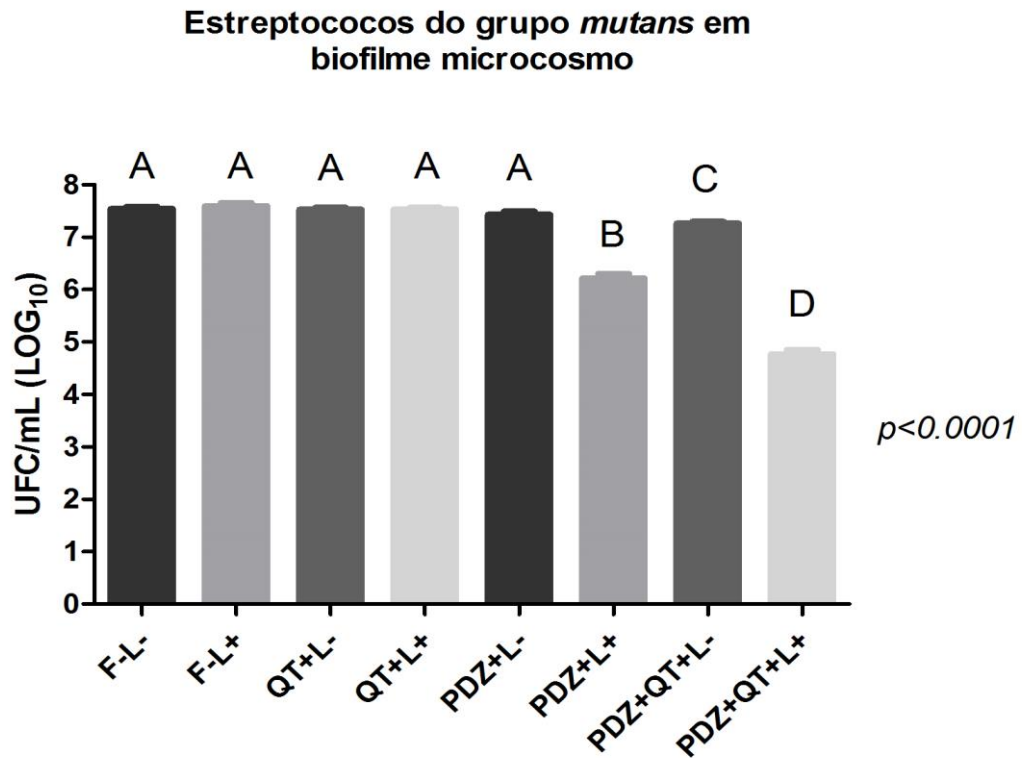
Figura 13 - Dados de UFC/mL de micro-organismos totais obtidos no teste de biofilme microcosmos orais com Photodithazine e quitosana



Legenda: Grupo controle (F-L-); Grupo somente luz (F-L+); Grupo quitosana sem luz (QT+L-); Grupo quitosana com luz (QT+L+); Grupo PDZ (PDZ+L-); Grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); Grupo PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L-); Grupo TFD com PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Dados de UFC/mL de estreptococos do grupo *mutans* obtidos no teste de biofilme microcosmos orais com Photodithazine e quitosana



Legenda: Grupo controle (F-L-); Grupo somente luz (F-L+); Grupo quitosana sem luz (QT+L-); Grupo quitosana com luz (QT+L+); Grupo PDZ (PDZ+L-); Grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); Grupo PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L-); Grupo TFD com PDZ mais quitosana (PDZ+QT+L+).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Com o crescente aumento da resistência bacteriana aos antibióticos existentes, pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de terapias alternativas para combater as infecções causadas por tais patógenos. Uma das terapias que tem mostrado eficácia como tratamento adjuvante para as doenças infecciosas é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Na odontologia, estudos avaliando o efeito da aplicação da TFD vêm crescendo rapidamente, principalmente como método para prevenção e tratamento da cárie dentária (Cieplik et al., 2017; Lara et al., 2019). Apesar da ampla eficácia apresentada pela TFD a partir de diversos fotossensibilizadores, inúmeros estudos apontam a incorporação da quitosana, um polímero natural, na tentativa de melhorar os efeitos produzidos por essa técnica (Camacho-Alonso et al., 2017; Chen et al., 2012; Lee et al., 2013; Shrestha, Kishen 2012)

A produção da quitosana, a partir de quitina, baseia-se nos descartes provenientes da indústria pesqueira. Os resíduos desse polímero natural são a maior fonte de poluição das áreas costeiras e a produção de quitosana a partir de conchas de crustáceos proveniente dos resíduos industriais, se torna favorável ao meio ambiente e economicamente viável (Synowiecki, Al-Khateeb, 2003). Os mecanismos responsáveis pelos efeitos antibacterianos apresentados pela quitosana podem ser diferentes de acordo com a cepa bacteriana e com as características químicas da própria quitosana, como grau de desacetilação e peso molecular (Jin Kim et al., 2019). Por este motivo, a quitosana foi utilizada como um possível potencializador da ação da TFD, mediada pelo fotossensibilizador Photodithazine sobre *Streptococcus mutans* e biofilme microcosmo.

Nesse estudo, os resultados da ação da TFD com quitosana alcançados sobre culturas planctônicas de *S. mutans* foram satisfatórios. O grupo controle, sem tratamento (F-L-) obteve um crescimento de 9,5 log de UFC/mL. Após irradiação o grupo PDZ+L+ apresentou uma redução de aproximadamente 2 log de UFC/mL em relação ao grupo controle (F-L-). Quando a solução de quitosana foi adicionada ao tratamento (PDZ+QT+L+) houve uma redução de 4,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle.

Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram a ação da quitosana na TFD com PDZ em culturas planctônicas de *S. mutans*. Porém é possível encontrar estudos que avaliaram seus efeitos na TFD mediada pela Clorina e6 (Ce6), em sua forma natural sobre outra espécie bacteriana Gram-positiva. Zhang et al. (2019) avaliaram os efeitos da Ce6 encapsulada em quitosana na TFD sobre *Staphylococcus aureus* (MRSA) utilizando o laser com potência de 100 mW/cm² por um período de irradiação de 15 min, e observaram redução do crescimento bacteriano de aproximadamente 2,5 log de UFC/mL em relação ao grupo tratado apenas com a TFD. Apesar de se tratar de micro-organismos distintos, resultados semelhantes foram encontrados em nossos estudos onde a associação da quitosana a TFD (PDZ+QT+L+) com um período de irradiação de 5 min e potência de 50 mW/cm² reduziu 2,5 log de UFC/mL do crescimento de *S. mutans* UA 159 em relação ao grupo sem a solução (PDZ+L+).

Chen et al. (2012) utilizaram eritrosina como fotossensibilizador e submeteram as células planctônicas da cepa ATCC25175 de *S. mutans* à TFD em associação à quitosana, obtendo uma redução de aproximadamente 3 log de UFC/mL em relação ao grupo controle. Porém, as células de *S. mutans* foram incubadas com quitosana/eritrosina por 10 minutos previamente à irradiação, quando mantiveram as células em contato com a quitosana/eritrosina por 12 h foi alcançado uma redução de 7 log de UFC/mL. Em nossos estudos as células bacterianas ficaram em contato com a solução de quitosana e o FS durante 15 min (tempo de pré-irradiação) obtendo uma redução de 4,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle.

Considerando que a formação de biofilmes por *S. mutans* sobre superfícies sólidas na cavidade bucal é conhecido como seu principal mecanismo de patogenicidade torna-se imprescindível a realização de estudos para controle do biofilme de *S. mutans* em materiais ou tecidos semelhantes aos existentes na cavidade bucal.

Como dentes humanos estão se tornando inacessíveis devido ao progresso e conservação dos mesmos com o avanço dos tratamentos e muitas vezes não estão disponíveis em número suficiente para propósito de pesquisas, dentes bovinos têm sido usados como substitutos para testes *in vitro* em pesquisas na área odontológica (Fonseca et al., 2004; Terra Garcia et al., 2018; Reis et al., 2004). A vantagem de utilizá-los como modelo experimental está na facilidade de obtê-los em

quantidades suficientes, devido à existência de um grande rebanho bovino no Brasil, onde a maior parte é direcionado à indústria alimentícia, ocorrendo alta disponibilidade de dentes bovinos que podem ser utilizados para pesquisa (Santana et al., 2011). Nogueira et al. (2014) afirmaram que a composição do esmalte dentário humano é semelhante à composição do esmalte dentário bovino, demonstrando que dentes bovinos são excelentes substitutos para dentes humanos. Por esse motivo, nesse estudo foi realizado a formação de biofilmes de *S. mutans* sobre corpos-de-prova confeccionados a partir de incisivos mandibulares permanentes de dentes bovinos.

Utilizando dentes bovinos, verificamos a eficácia da TFD sobre biofilmes de *S. mutans*. Quishida et al. (2015) avaliaram a ação da TDF com diferentes concentrações de PDZ em biofilmes multiespécie de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* em fundo de placa, observando uma redução de aproximadamente 2 e 3 log de UFC/mL quando associados às concentrações de 175 e 200 mg/mL de PDZ respectivamente. Quando o PDZ foi utilizado na TFD em nossos estudos sem adição de quitosana, obteve-se uma redução de 2 log de UFC/mL em relação ao grupo controle, semelhante aos resultados encontrados pelos autores, porém a partir de uma concentração de PDZ menor (0,6 mg/mL). A diferença nas concentrações necessárias para obtenção do efeito antimicrobiano pode estar relacionada ao biofilme ser multiespécie e não apenas de *S. mutans* como em nossos estudos ou à diferença de corpo-de-prova que pode influenciar em sua susceptibilidade ao tratamento.

Chen et al. (2012) avaliaram a ação da TFD mediada por eritrosina associada a quitosana sobre biofilmes de *S. mutans* cultivados em superfície de discos de aço inoxidável. Os resultados desse trabalho apresentaram maior eficácia antimicrobiana nos grupos associados a quitosana, com redução de 2,5 e 4,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle com 10 min e 2 h de incubação com eritrosina/quitosana previamente a irradiação respectivamente e total erradicação do biofilme de *S. mutans* com 12 h de incubação, utilizando a densidade de energia de 50 J/cm² para irradiação. Em nossos estudos foi utilizado a densidade de energia de 15 J/cm² e um período de incubação das células bacterianas de 15 min com o PDZ e quitosana previamente a irradiação, com obtenção de aproximadamente 4,5 log de UFC/mL de redução em relação ao grupo controle e 2,5 log de UFC/mL de redução em relação grupo tratado apenas com TFD. Esses dados, assim como os obtidos em

culturas planctônicas, podem sugerir que a eficiência da quitosana na TFD é dependente do tempo de contato com as células bacterianas, além da interferência dos parâmetros de irradiação utilizados.

Camacho-Alonso et al. (2017) estudaram a ação da TFD mediada por azul de metileno associada à quitosana contra biofilmes de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 formados sobre canais radiculares de dentes humanos extraídos. No resultado apresentado pelos autores não houve diferença entre o grupo TFD (Azul de Metileno + Luz) e o grupo TFD + Quitosana. Fabio et al. (2016) também avaliaram a capacidade da quitosana em potencializar a TFD com azul de metileno, sobre biofilmes de *Candida albicans* NCPF 3281, *in vivo* em modelo murino, e os resultados apresentados demonstraram que a quitosana não possuiu efeito potencializador sobre o azul de metileno. Indicando que os efeitos da quitosana na TFD podem ser influenciados pelo fotossensibilizador utilizado, provavelmente devido à interferência das características fotoquímicas de ambas as moléculas e parâmetros de irradiação utilizados.

Analisando as imagens de MEV observamos que os grupos F-L-; F-L+; PDZ+L- e PDZ+QT+L- apresentaram agregados densos de células de *S. mutans* com muita matriz extracelular recobrimo o corpo-de-prova. No tratamento com TFD (PDZ+L+), foi possível visualizar redução desses aglomerados celulares. A redução do biofilme formado provocada pela ação da TFD se tornou ainda mais evidente no grupo com adição de quitosana (PDZ+QT+L+), no qual foi possível visualizar células individuais com áreas livres de mico-organismos, possibilitando evidenciar a superfície do corpo-de-prova do esmalte dentário. Resultados semelhantes foram observados por Shrestha e Kishen (2014), que encontraram, em MEV, uma redução significativa da massa de biofilmes multiespécies tratados com quitosana e TFD mediada pelo fotossensibilizador rosa bengala.

Existe uma grande importância para a realização de estudos com cepas padrão (ATCC), pois podem ser reproduzidos e utilizados como parâmetro em qualquer lugar do mundo. Entretanto, uma vez que biofilmes dentários são formados por diferentes espécies bacterianas estudo *in vitro* de agentes antimicrobianos não devem ser limitados à testes formados por uma única espécie microbiana. Assim, etapa seguinte do trabalho foi utilizado o modelo de biofilme microcosmos, formados a partir de saliva humana, que representa com maior fidelidade a diversidade microbiológica da cavidade bucal. Ainda, nessa fase utilizou-se a Biotable à base de

LED como fonte de luz. A escolha foi determinada por algumas características como, emissão de luz à área total da microplaca de uma só vez e fácil portabilidade, promovendo a otimização dos processos fotodinâmicos desenvolvidos. Em estudos de Zanin et al. (2005) após comparar os efeitos de um laser HeNe com uma luz LED na Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Toluidina demonstraram que ambas possuíram o mesmo efeito antimicrobiano na viabilidade no biofilme de *S. mutans*.

Nossos resultados demonstram que a TFD (LED) mediada por PDZ diminuiu significativamente a contagem bacteriana de biofilmes de microcosmos orais em ambos os grupos de micro-organismos. Com maior redução após a associação da quitosana à terapia. Além disso, não foram observadas alterações no grupo controle apenas irradiado (F-L+) demonstrando não haver a ação da luz sobre os grupos de micro-organismos.

A literatura não possui estudos que avaliem os efeitos antimicrobianos da TFD sobre biofilme microcosmos com parâmetros iguais aos utilizados em nosso trabalho. Porém, Teixeira et al. (2012) realizaram Terapia Fotodinâmica (LED) mediada por Azul de Toluidina em biofilmes microcosmos advindos de saliva humana, nesse caso *in situ*, no qual a terapia não apresentou efeito antimicrobiano sobre os estreptococos do grupo *mutans*. De Oliveira et al. (2018) também estudaram os efeitos da TFD (LED) mediada por Azul de Toluidina, sobre biofilmes microcosmos orais advindos de molares permanentes parcialmente erupcionados, *in vitro*, e diferenças estatísticas significativas foram observadas apenas na contagem de micro-organismos totais, não mostrando também efeito sobre a contagem de estreptococos do grupo *mutans*. Enquanto isso, Vasconcelos et al. (2019) avaliaram os efeitos da TFD (Laser) mediada por Azul Metileno associada a nanopartículas de b-ciclodextrina sobre biofilme microcosmos salivares, *in vitro*, obtendo redução de 2,1 log de UFC/mL de estreptococos do grupo *mutans* em relação ao grupo controle. Embora, existam diferenças entre as metodologias, como tipo de fotossensibilizador, fonte de luz e modelo de ensaio, os resultados obtidos em nosso trabalho apresentaram maior significância estatística em relação aos trabalhos citados, no qual os estreptococos do grupo *mutans* foram mais susceptíveis aos efeitos da terapia, havendo redução de 2,7 log de UFC/mL após a associação da quitosana à TFD, enquanto isso, a redução máxima obtida na análise total de micro-organismos foi 1,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle.

Uma terapia fotodinâmica ideal deve induzir o efeito antimicrobiano somente após irradiação por uma fonte de luz adequada. Para demonstrar isso, avaliamos a toxicidade do fotossensibilizador no escuro. Nos estudos planctônicos com a cepa de *S. mutans* UA 159 o grupo incubado com o fotossensibilizador (PDZ+L-) não apresentou nenhuma toxicidade quando mantido no escuro, porém quando a quitosana foi adicionada (PDZ+QT+L-) houve uma redução de aproximadamente 2,5 log de UFC/mL em relação ao grupo controle (F-L-) e ao grupo tratado apenas com o FS. Resultados semelhantes foram descritos por Chen et al. (2012), no qual os grupos incubados com o FS (eritrosina) e quitosana na ausência de luz apresentaram redução no número de células de *S. mutans*. Sugerindo que a quitosana pode aumentar a interação entre o FS e a célula bacteriana mesmo na ausência de irradiação levando à toxicidade.

Em nossos estudos sobre biofilmes formados por *S. mutans* UA 159 nenhuma toxicidade no escuro foi identificada tanto no grupo incubado apenas com fotossensibilizador (PDZ+L-) como no grupo com adição de quitosana (PDZ+QT+L-). Em relação aos biofilmes microcosmos, os grupos de micro-organismos analisados foram susceptíveis ao efeito da associação quitosana ao fotossensibilizador mesmo na ausência de luz (PDZ+QT+L-). Os biofilmes são formas microbianas naturalmente mais resistentes, porém as interações interespecies que ocorrem em biofilmes mistos, como no modelo microcosmo, podem se apresentar de forma positiva como também de maneira negativa. Entre as interações negativas estão, competição por sítio de adesão, produção de bacteriocinas e redução de pH por um dos membros do biofilme, como espécies de *Lactobacillus* frequentemente isolados da cavidade oral (Kohler et al., 2012; Orsi et al., 2014; Ribeiro et al., 2019; Rossoni et al., 2018; Sabia et al., 2014). Esses fatores podem dificultar o desenvolvimento das espécies que compõe o biofilme, o que pode explicar a maior susceptibilidade dos biofilmes microcosmos à ação da quitosana associada ao FS em relação ao biofilme mono espécie.

Estudos têm sugerido que o papel da quitosana na TFD provavelmente seria permitindo fácil penetração do FS nas células bacterianas por perturbação da membrana plasmática por meio de interações eletroestáticas entre os grupamentos amino da molécula de quitosana carregados positivamente (NH_3^+) e os grupamentos fosfato aniônicos presentes na membrana plasmática de bactérias (Chen et al., 2013; Choi et al., 2014).

Em nossa avaliação da capacidade das células de *S. mutans* (UA 159) em absorver o fotossensibilizador, demonstramos que a associação da quitosana ao PDZ aumenta a penetração do mesmo nas células bacterianas, apresentando uma DO de 3,0 o dobro quando comparado com a capacidade das células em absorver o PDZ sem associação da quitosana, que apresentou uma DO de aproximadamente 1,5. Em relação à quitosana isoladamente, as células de *S. mutans* não apresentaram capacidade em absorver a solução, possuindo o mesmo padrão de DO observado no grupo controle. Esses dados podem explicar a maior eficácia antimicrobiana obtida pela associação da quitosana na TFD mediada pelo PDZ em relação à TFD sem adição da solução nos estudos da contagem de UFC/mL.

Os resultados encontrados em nosso trabalho demonstram que a quitosana apresentou efeito potencializador sobre a Terapia Fotodinâmica mediada por PDZ sobre *Streptococcus mutans* UA 159 e biofilme microcosmos orais.

6 CONCLUSÃO

- a) Conclui-se com esse estudo que o Photodithazine é um fotossensibilizador eficaz na Terapia Fotodinâmica com Laser contra células planctônicas e biofilmes de *S. mutans* UA 159;
- b) A quitosana apresentou capacidade em potencializar a Terapia Fotodinâmica com Laser mediada por Photodithazine sobre culturas planctônicas e biofilmes de *S. mutans* UA 159;
- c) A quitosana aumentou a permeabilidade da célula de *S. mutans* UA 159 ao Photodithazine;
- d) A Terapia Fotodinâmica com LED mediada por Photodithazine e associada à quitosana foi capaz de reduzir a contagem de microorganismos totais e estreptococos do grupo *mutans* em biofilmes microcosmos orais.

REFERÊNCIAS*

- Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016 Feb 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942.
- Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis.* 2004 Sep;10(5):249-57. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01030.x.
- Awan MA, Tarin SA. review of photodynamic therapy. *Surgeon.* 2006;4(4):231-6. doi:10.1016/s1479-666x(06)80065-x
- Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res.* 2011;45(6):510-7. doi: 10.1159/000331210. Epub 2011 Sep 29.
- Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):20523-59. Published 2015 Aug 31. doi:10.3390/ijms160920523.
- Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010 Apr;56(3):290-9. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.09.015.
- Battisti MV, Campana-Filho SP. Preparation and characterization of α -chitin and chitosan from the shells of *Macrobrachium rosenbergii*. *Quím Nova,* 2008;31(8): 2014-9. doi: 10.1590/S0100-40422008000800019.
- Caires CSA, Leal CRB, Ramos CAN, Bogo D, Lima AR, Arruda EJ, et al. Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Lasers Med Sci.* 2017;32(5):1081–8.
- Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol.* 2012 May-Jun;88(3):512-22. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01107.x.
- Camacho-Alonso F, Julián-Belmonte E, Chiva-García F, Martínez-Beneyto Y. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy and chitosan in root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2017 Apr;35(4):184-9. doi: 10.1089/pho.2016.4148.
- Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. Correction: In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2017;16(8):1336-7. doi:10.1039/c7pp90027a.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Casas A, Venosa GD, Hasan T, Al Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2486-515. doi:10.2174/092986711795843272.

Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review. *Med Mycol*. 2018;56(6):653-67. doi:10.1093/mmy/myx111.

Chen CP, Chen CT, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and *in vitro* investigation. *Photochem Photobiol*. 2013;88:570–6. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01101.x. Epub 2012 Feb 21.

Cheon K, Moser S, Wiener H, Whiddon J, Momeni S, Ruby J, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci*. 2013 Jun;121(3 Pt 1):148-55. doi: 10.1111/eos.12044. Epub 2013 Apr 19.

Chien HF, Chen CP, Chen YC, Chang PH, Tsai T, Chen CT. The use of Chitosan to enhance photodynamic inactivation against *Candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. *Int J Mol Sci*. 2013 Apr 3;14(4):7445-56. doi: 10.3390/ijms14047445.

Choi SS, Lee HK, Chae HS. Synergistic *in vitro* photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and chitosan against *Helicobacter pylori* 26695. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2014 Dec;11(4):526-32. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.08.005.

Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions-A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:54-62. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.005.

Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses*. 2013;56(6):614-22. doi:10.1111/myc.12092.

Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quím Nova*, 2006;29:776-85.

Costa EM, Silva S, Costa MR, Pereira M, Campos DA, Odila J, et al. Chitosan mouthwash: toxicity and *in vivo* validation. *Carbohydr Polym*. 2014 Oct 13;111:385-92. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.046.

Costa SP. Biodegradabilidade de n-Hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana [dissertação]. Pernambuco (Recife): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.

de Carvalho Leonel L, Carvalho ML, da Silva BM, Zamuner S, Alberto-Silva C, Silva Costa M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Jun;26:316-23. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.026.

de Oliveira FS, Cruvinel T, Cusicanqui Méndez DA, Dionísio EJ, Rios D, Machado MAAM. The *in vitro* effect of antimicrobial photodynamic therapy on dental

- microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Mar;21:163-7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.005.
- de Oliveira KT, de Souza JM, Gobo NRS, de Assis FF, Brocksom TJ. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. *Rev Virtual Quim.* 2015;7(1):310-35. doi: 10.5935/1984-6835.20150016.
- Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling.* 2013;29(9):1057-67. doi: 10.1080/08927014.2013.827668.
- Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163(1):1-12. doi:10.1016/j.micres.2007.08.001.
- Durso SC, Vieira LM, Cruz JNS, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MRL. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res.* 2014;48(3):214-22. doi: 10.1159/000354410.
- Dutta J, Tripathi S, Dutta PK. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.* 2004 Sep 1;95(2):147-55. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.
- Fabio CA, Yolanda MB, Carmen GM, Francisco C, Antonio Julián B, Leonor PL, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivación of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med.* 2016 Sep;45(8):627-33. doi: 10.1111/jop.12435. Epub 2016 Mar 15.
- Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys Lett.* 2008; 5(2):156-61. doi: 10.1002/lapl.200710099.
- Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiology and Immunology.* 2007; 22(2):73-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00323.x>.
- Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11):912-22. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.05.006.
- Friedman AJ, Phan J, Schairer DO, Champer J, Qin M, Pirouz A, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1231–9. doi:10.1038/jid.2012.399.
- Garcez AS, Neto JG, Sellera DP, Fregnani E. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis and photodyn ther.* 2015;12(4):575-580. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.06.002.

George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt.* 2007;12(3):034029. doi:10.1117/1.2745982.

Guibal E, Saucedo I, Jansson-Charrier M, Delanghe B, Le Cloirec P. Uranium and vanadium sorption by chitosan and derivatives. *Water Sci Technol.* 1994;30(9):183–90. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0475>.

Hejazi R, Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J Control Release.* 2003;89(2):151–65. doi:10.1016/s0168-3659(03)00126-3.

Hyppólito MP. Efeitos da quitosana na inativação fotodinâmica de *Escherichia coli*. [dissertação]. Uberlândia (Minas Gerais): Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

Ibanez Simplicio F, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 2002;25(5):801–7. doi: 10.1590/S0100-40422002000500016.

Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998;15(9):1326–31. doi:10.1023/a:1011929016601.

Ivanov AV, Reshetnickov AV, Ponomarev GV. One more PDT application of chlorin e6. *Proc SPIE.* 2000;3909:131–7.

Junior JCC dos S, Izabel T dos SS. Microbiota Oral e Sua Implicação no Binômio Saúde-Doença. *Rev Context. Saúde.* 2019;19:91–9.

Kim EJ, Choi JH, Yang HJ, Choi SS, Lee HK, Cho YC, et al. Comparison of high and low molecular weight chitosan as in-vitro boosting agent for photodynamic therapy against *Helicobacter pylori* using methylene blue and endoscopic light. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:111–5. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.03.005.

Kim JY, Choi WI, Kim M, Tae G. Tumor-targeting nanogel that can function independently for both photodynamic and photothermal therapy and its synergy from the procedure of PDT followed by PTT. *J Control Release.* 2013;171(2):113–21. doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.006.

Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;2012:636474. doi: 10.1155/2012/636474.

Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget.* 2017 Oct 6; 8(46): 81591–603. doi: 10.18632/oncotarget.20189.

Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7193–203. doi: 10.1128/JB.187.21.7193-7203.2005.

Lara ALVG, Curylofo-Zotti FA, Borsatto MC, de Souza Salvador SL, Valério RA, Souza-Gabriel AE, et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy in carious

lesion. Randomized split-mouth clinical trial in primary molars. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Feb 23. pii: S1572-1000(18)30399-5. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.02.018.

Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;19:1–4. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.04.004>

Lee HM, Jeong YI, Kim do H, Kim CH, Kang DH. Ursodeoxycholic acid-conjugated chitosan for photodynamic treatment of HuCC-T1 human cholangiocarcinoma. *Int J Pharm.* 2013;454(1):74-81. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.035.

Lee SJ, Koo H, Lee DE, Min S, Lee S, Chen X, et al. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. *Biomaterials.* 2011;32(16):4021-9. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.009.

Lozano-Navarro JI, Díaz-Zavala NP, Velasco-Santos C, Martínez-Hernández AL, Tijerina-Ramos BI, García-Hernández M, et al. Antimicrobial, Optical and Mechanical Properties of Chitosan-Starch Films with Natural Extracts. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):997. doi:10.3390/ijms18050997.

Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.* 2004 Sep 1;95(2):147-55. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.

Llena-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Aug;11(5):E449-55.

Lyon JP, Moreira LM, de Moraes PC, dos Santos FV, de Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses.* 2011;54(5):265-71. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x.

Manoil D, Filieri A, Cécile G, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Sep;11(3):372-9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.06.003.

Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010 Jul;54(3):441-54. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.002.

Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci.* 2018;33(3):479–87. doi:10.1007/s10103-017-2379-3.

Mooduto L, Wahjuningrum DA, A AP, Lunardhi CGJ. Antibacterial effect of chitosan from squid pens against *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *Iran J Microbiol.* 2019;11(2):177–80.

Nogueira BCL, Fernandes PM, Paiva ACJ, Fagundes NCF, Teixeira FB, Lima RR. Avaliação comparativa da ultraestrutura e propriedades físicas do esmalte bovino, bubalino e humano. *Pesqui Vet Bras.* 2014;34(5):485–90. doi:10.1590/S0100-736X2014000500017.

Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, et al. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014 Oct-Dec;28(4):743-52.

Panhóca VH. Efeito *in vitro* e *in vivo* da terapia fotodinâmica antimicrobial sobre *Streptococcus mutans* presentes em acessórios metálicos ortodônticos [dissertação]. São Carlos (São Paulo): Universidade Federal De São Carlos, 2011.

Pires JG, Braga AS, Andrade FB, Saldanha LL, Dokkedal AL, Oliveira RC, et al. Effect of hydroalcoholic extract of on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization Abstract. *J Appl. Oral Sci.* 2019;1:1–9. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0514.

Quishida CCC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):685-94. doi: 10.1007/s10103-013-1397-z.

Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SRP. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2):117-21. PMID: 15293420.

Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X, et al. Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):126–35. doi:10.1128/AAC.00919-15.

Reza MS, Tabatabaie RM, Maharramov A, Ali Ramazanov M. Synthesis and *in vitro* studies of biodegradable modified chitosan nanoparticles for photodynamic treatment of cancer. *Int J Biol Macromol.* 2011;49(5):1059-65. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.08.031.

Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, Santos JD, Fugisaki LRO, Leão MPV, et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *J Appl Microbiol.* 2019 Nov 9. doi: 10.1111/jam.14511.

Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FC, Velloso MDS, Fuchs BB, et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling.* 2018 Feb;34(2):212-225. doi: 10.1080/08927014.2018.1425402.

Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014 Jul;32(3):415-25, x. doi: 10.1016/j.det.2014.03.009.

Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol.* 2012 Dec;113(6):1540-53. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05439.x.

Sabia C, Anacarso I, Bergonzini A, Gargiulo R, Sarti M, Condò C, et al. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus*

fermentum CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe*. 2014 Apr;26:41-5. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.01.004.

Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol*. 2015;(1):1–7. doi: 10.3402/jom.v7.26149.

Santana LDNS, Luz MS, Carneiro NCM, Dias AM, Cristina M, Lima RR. Ultrastructure of buffalo tooth enamel : a possible replacement for human teeth in laboratory research. *Braz J Oral Sci*. 2011;10(3):163–6.

Shrestha A, Kishen A. Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2012;88(3):577-83. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01026.x.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;(28):12-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x.

Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal M, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):187. doi: 10.1186/s12866-015-0524-3.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011;55(1):143-66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x

Sueoka K, Chikama T, Pertiwi YD, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, et al. Antifungal efficacy of photodynamic therapy with TONS 504 for pathogenic filamentous fungi. *Lasers Med Sci*. 2018 Oct 4. doi: 10.1007/s10103-018-2654-y.

Strakhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*. 2002;71:298–301. <https://doi.org/10.1023/A:1015802627482>.

Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):145-71. doi: 10.1080/10408690390826473.

Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 24(2):152–61. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00489.x.

Tan Y, Cheng Q, Yang H, Li H, Gong N, Liu D, et al. Effects of ALA-PDT on biofilm structure, virulence factor secretion, and QS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Dec;24:88-94. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.07.005.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *in vitro* and *in situ* biofilms. *Caries Res*. 2012;46(6):549-54. doi: 10.1159/000341190.

- Terra Garcia M, Correia Pereira AH, Figueiredo-Godoi LMA, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Dec;24:256-61. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.08.012.
- Touger-Decker R, van Loveren C. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(4):881S-92S. doi:10.1093/ajcn/78.4.881S.
- Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. *Carbohydr Polym*. 2013;91(1):452-66. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.076
- Van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 2011 Oct;27(9):1057-63. doi: 10.1080/08927014.2011.625473.
- Vasconcelos MEOC, Cardoso AA, da Silva JN, Alexandrino FJR, Stipp RN, Nobre-Dos-Santos M, et al. Combined Effectiveness of β -Cyclodextrin Nanoparticles in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on In Vitro Oral Biofilms. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019 Sep;37(9):567-73. doi: 10.1089/photob.2019.4669.
- Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008;53(9):61-109. doi:10.1088/0031-9155/53/9/R01.
- Wu FC, Tseng RL, Juang RS. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. *J Environ Manage*. 2010 Mar-Apr;91(4):798-806. doi: 10.1016/j.jenvman.2009.10.018.
- Zanin IC, Gonçalves RB, Brugnera Junior A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(2):324-30. doi:10.1093/jac/dki232.
- Zhang R, Li Y, Zhou M, Wang C, Feng P, Miao W, Huang H. Photodynamic chitosan nano-assembly as a potent alternative candidate for combating antibiotic-resistant bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(30): 26711–21. doi:10.1021/acsami.9b09020.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética

Título da Pesquisa: Associação da quitosana na terapia fotodinâmica para controle de Streptococcus mutans e biofilme microcosmos

Pesquisador Responsável: Maira Terra Garcia

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 28484720.8.0000.0077

Submetido em: 28/01/2020


Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1500291