

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/03/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



EMANUELLE TEIXEIRA CARRERA

**MODIFICAÇÃO EM FOTOSSENSIBILIZADOR E SUA APLICAÇÃO NA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATO
DENTINÁRIO**

Araraquara
2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



EMANUELLE TEIXEIRA CARRERA

**MODIFICAÇÃO EM FOTOSSENSIBILIZADOR E SUA APLICAÇÃO NA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATO
DENTINÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Concentração em Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli

Araraquara
2016

Carrera, Emanuelle Teixeira

Modificação em fotossensibilizador e sua aplicação na terapia fotodinâmica antimicrobiana em substrato dentinário / Emanuelle Teixeira Carrera.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

85 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

1. Fotoquimioterapia 2. Azul de metileno 3. Streptococcus
mutans 4. Biofilmes 5. Cárie dentária I. Título

EMANUELLE TEIXEIRA CARRERA

MODIFICAÇÃO EM FOTOSSENSIBILIZADOR E SUA APLICAÇÃO NA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATO
DENTINÁRIO

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia

3º Examinador: Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 31 de Março de 2016.

Dados Curriculares

EMANUELLE TEIXEIRA CARRERA

NASCIMENTO:	09/10/1990 – Dracena, São Paulo
FILIAÇÃO:	Manoela Cristina Teixeira Carrera Marcos Luis Alves Carrera
2009-2013:	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2014-2016:	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Dentística Restauradora, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014-2015:	Curso de Atualização em Dentística Estética na Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia-Unesp
2015-2015:	Estágio Docência na Disciplina de Dentística I, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus**, por guiar meus passos e por me conceder o dom da vida.

Aos meus pais, **Manoela** e **Marcos**, e minha irmã **Letícia**, por me terem dado educação, valores e pelo incentivo em cada passo que dei. O apoio de vocês sempre me encoraja e me dá forças e motivação para querer conseguir mais. Vocês são meu alicerce. Eu amo vocês!!!

Ao meu marido, **Ricardo**, por todo seu amor, carinho, apoio, companheirismo, incentivo, palavras de conforto, paciência e compreensão. Obrigada por ser meu exemplo de profissional e ser humano. Você é meu porto seguro e ao seu lado quero conquistar o infinito. Obrigada por me fazer tão feliz...Eu te amo!!!

"A família é a base da sociedade, e o lugar onde as pessoas aprendem pela primeira vez os valores que os guiarão durante toda a vida."

Papa João Paulo II

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na presença de seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Julio Cezar Durigan**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela **Profª. Drª. Andréia Affonso Barretto Montandon** (Diretora) e **Profª. Drª. Elaine Maria Sgavioli Massucato** (Vice-Diretora).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, coordenado pelo **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior**.

Aos docentes da disciplina de Dentística Restauradora: **Profª. Drª. Alessandra Nara de Souza Rastelli**, **Profª. Drª. Andrea Abi Rached Dantas**, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, **Prof. Dr. José Roberto Cury Saad**, **Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi Andrade**, **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior** e **Prof. Dr. Sizenando de Toledo Porto Neto** pelos ensinamentos.

À **Profª. Drª. Alessandra Nara de Souza Rastelli**, minha orientadora, primeiramente por ter me recebido nesta Faculdade e me aceitado em seu grupo de pesquisa. Obrigada pela sua orientação, amizade, ensinamentos, confiança depositada em mim e apoio em minha vida acadêmica. Obrigada!!!

Aos amigos e colegas de pós graduação e graduação, em especial **Hércules Bezerra Dias e Priscila Cortez**, pela amizade e agradável convivência.

Ao **Prof. Adilson César Abreu Bernardi**, professor do Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), por disponibilizar seu laboratório para realização de parte da pesquisa, por todo seu ensinamento e palavras de carinho.

Às técnicas do laboratório da UNIARA, **Lu e Marisa**, por todo carinho, respeito e ajuda, vocês são demais.

Aos meus queridos sogros **Eduardo Carrera Maranhão e Maria Regina Roselli Carrera**, por tornar esta caminhada mais agradável.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Mara Cândida Munhoz do Amaral, José Alexandre Garcia e Cristiano**, pela disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Creuza, Dona Cida, Alessandra, Marinho e Vanderlei**, pela disponibilidade e ajuda.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro concedido durante o curso de mestrado.

Ao Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, em especial ao **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato** pela disponibilização da estrutura física para a realização de parte da pesquisa.

Ao **Dr. Sebastião Pratavieira**, Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial, do Grupo de óptica do Instituto de Física de São Carlos, pela ajuda para obtenção das imagens da Microscopia Confocal a Laser.

E a todos que de alguma forma colaboraram com esta etapa...

Carrera ET. Modificação em fotossensibilizador e sua aplicação na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em substrato dentinário. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O objetivo deste trabalho, dividido em dois estudos, foi avaliar: (1) *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica na viabilidade de cultura planctônica de *Streptococcus mutans* mediada por azul de metileno associado ou não por nitrato de sódio em combinação com Laser; e (2) avaliar *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica na viabilidade do biofilme de *Streptococcus mutans* mediado por azul de metileno associado ou não por nitrato de sódio, ambos em associação com Laser em comprimento de onda vermelho (660nm). No primeiro estudo, a suspensão bacteriana contendo *Streptococcus mutans* 1×10^8 UFC/mL foi preparada e 250 μ L foi pipetada de acordo com os grupos: L-D- (controle negativo), L-D+ (fotossensibilizador associado ou não em 6 concentrações: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μ M), L+D- (Laser 30J/cm²), clorexidina (controle positivo), nitrato de sódio e o grupo L+D+ (azul de metileno associado ou não ao nitrato de sódio e irradiado com Laser). Para citotoxicidade no escuro, foram acrescentados 250 μ L do azul de metileno associado ou não, incubado no escuro por 5 minutos. Os grupos da terapia fotodinâmica foram incubados no escuro por 5min e irradiados por Laser 30 segundos. Alíquotas de cada diluição foram cultivadas em Placa de Petri com BHI ágar e incubadas a 37° C em estufa por 48h para posterior contagem das UFC/mL. Os resultados obtidos demonstraram que não houve citotoxicidade no escuro para as diferentes concentrações utilizadas do azul de metileno associado ou não. Observou-se redução completa na viabilidade do *Streptococcus mutans* em fase planctônica nas concentrações entre 0,625 e 5 μ M para azul de metileno associado. No segundo estudo induziu-se os biofilmes sobre fragmentos de dentina bovina (3x3x2mm) e foram divididos em grupos: L-D- (controle negativo), L-D+ (fotossensibilizador associado ou não em 6 concentrações: 0,625; 1,2; 2,5; 5; 10 e 20 μ M), L+D- (Laser 30J/cm²), clorexidina (controle positivo), nitrato de sódio e grupo L+D+ (azul de metileno associado ou não e irradiado com Laser). Para a citotoxicidade no escuro, foram adicionados azul de metileno associado ou não, incubados no escuro por 5 minutos. Os grupos da terapia fotodinâmica foram incubados no escuro por 5 minutos e irradiados por Laser 30 segundos. Alíquotas de cada diluição foram cultivados em Placas de Petri com BHI ágar e incubados em estufa por 48h para posterior contagem de UFC/mL. Para ambos os trabalhos, os dados foram transformados em log₁₀, analisados por ANOVA um e dois fatores e teste de Tukey $p < 0,05$. Os resultados mostraram reduções significativas na viabilidade no biofilme de *Streptococcus mutans* quando expostos ao azul de metileno associado ao nitrato de sódio,

2,13 log₁₀ para [2,5µM] e 2,37 log₁₀ para [5µM], comparado com o azul de metileno não associado. Pode-se concluir que em ambos os estudos a associação do fotossensibilizador quando associado ao Laser promoveram redução significativa tanto para cultura planctônica quanto para o biofilme de *Streptococcus mutans* quando comparado com o fotossensibilizador não associado, sendo mais eficiente que a clorexidina, podendo ser uma técnica viável para eliminar ou reduzir essas bactérias na cavidade oral.

PALAVRAS-CHAVES: Fotoquimioterapia. Azul de Metileno. *Streptococcus mutans*. Biofilmes. Cárie Dentária.

Carrera ET. Modified Photosensitizer and its application in photodynamic therapy over dentinal substrate. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The aim of this work, divided into two studies, was to evaluate: (1) the *in vitro* the effect of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* planktonic culture mediated by methylene blue associated or not by sodium nitrate in association with red Laser; and (2) the *in vitro* the effect of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* biofilm mediated by methylene blue associated or not by sodium nitrate in association with red Laser (660nm). In the first study the bacterial suspension containing *Streptococcus mutans* 1×10^8 CFU/mL was prepared and 250 μ L pipetted according to the groups: L-P- (negative control), L-P+ (photosensitizer associated or no at 6 concentrations: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ M), L+P- (Laser 30J/cm²), chlorhexidine (positive control), sodium nitrate and group L+P+ (methylene blue associated or not with sodium nitrate and irradiated with Laser). For the dark cytotoxicity test, 250 μ L of methylene blue associated or not, were added and incubated in the dark for 5 minutes. The groups of photodynamic therapy were incubated in the dark for 5 minutes and irradiated by red Laser during 30 seconds. Samples were incubated at 37° C during 48h for subsequent visual counting of CFU/mL. The results showed that there was no cytotoxicity in the dark for the different concentrations of methylene blue associated or not. The photodynamic therapy promoted complete reduction in the viability of *Streptococcus mutans* at concentrations between 0.625 and 5 μ M for associated methylene blue. For the second study was induced biofilms on the bovine dentin fragments (3x3x2mm) and was divided in groups: PS-L- (negative control), PS+L- (photosensitizer associated or no at 6 concentrations: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ M), P-L+ (Laser 30J/cm²), chlorhexidine (positive control), sodium nitrate and group P+L+ (methylene blue associated or not with sodium nitrate and irradiated with Laser). For the dark cytotoxicity test, methylene blue associated or not were added and incubated in the dark for 5 minutes. The groups of photodynamic therapy were incubated in the dark for 5 minutes and irradiated by red Laser during 30 seconds. Samples were incubated at 37° C during 48h for subsequent visual counting of CFU/mL. For both works, data were transformed into log₁₀, analyzed by one and two-way ANOVA and Tukey's test at $p < 0.05$. The results showed significant decreases in the viability of biofilm *Streptococcus mutans* when exposed to associated methylene blue, 2.13 log₁₀ to [2.5 μ M] and 2.37 log₁₀ to [5 μ M], compared with methylene blue not associated. Can be concluded that in both works photosensitizer association, associated with red Laser

caused significant reduction in both the planktonic culture as for the biofilm of *Streptococcus mutans* biofilm when compared with the photosensitizer not associated, being more effective than chlorhexidine, may be a viable technique to eliminate or reduce these bacteria in the oral cavity.

KEYWORDS: Photochemotherapy. Methylene blue. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Dental Caries.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana)
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AM	Azul de Metileno
ANOVA	Análise de Variância
BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLX	Clorexidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Luz Amplificadora por Estimulo Emissor de Radiação)
LED	Light Emitting Diode (Luz Emissora de Diodo)
N	Nitrato de Sódio
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
NI	Nitrado de Sódio Irradiado
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina Tamponada Fosfatada)
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
PIA	Polissacarídeo Adesina Intercelular
SD	Standard Deviation (Desvio Padrão)
TBO	Toluidine Blue O (Azul de Orto-Toluidina)
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV-Vis	Energia Eletromagnética na Região do Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	PROPOSIÇÃO.....	20
3	PUBLICAÇÕES.....	21
3.1	Artigo 1: Photodynamic effects of methylene blue associated by sodium nitrate against <i>Streptococcus mutans</i> in a planktonic culture.....	22
3.2	Artigo 2: Susceptibility of <i>Streptococcus mutans</i> biofilms to photodynamic therapy using methylene blue associated with sodium nitrate.....	40
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A- METODOLOGIA ARTIGO 1.....	68
	APÊNDICE B- METODOLOGIA ARTIGO 2.....	69
	ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética.....	71

1 INTRODUÇÃO

Na cavidade oral dos seres humanos já foi detectada a presença de grande diversidade de microrganismos, como bactérias, vírus, protozoários e fungos (Marcotte, Lavoie¹⁷, 1998), que são denominados como microbiota residente (Zanin et al.³⁷, 2003). Esses microrganismos normalmente se encontram organizados na forma de biofilmes (Zanin³⁶, 2005).

O motivo para a colonização destes microrganismos na cavidade oral se deve pelo ambiente favorável que lhes é proporcionado, como a presença de secreções, nutrientes e restos epiteliais (Araújo et al.⁴, 2012).

Algumas espécies de microrganismos, organizados na forma de biofilmes, são responsáveis por várias doenças na cavidade oral, como a cárie dental, doença periodontal, candidíase e mal hálito, além de infecções de natureza endodôntica (Soukos, Goodson³⁰, 2011). Biofilmes orais são complexos constituídos por várias espécies de microrganismos competindo por um espaço limitado e por nutrientes para sobreviverem e em condições saudáveis mantem um equilíbrio ecológico (Kreth et al.¹³, 2008).

Na superfície dos elementos dentários ocorre a formação e deposição de uma camada acelular, denominada de película adquirida, que é formada por componentes bacterianos, salivares e do fluido gengival (Zanin³⁶, 2005). Em seguida ocorre a colonização pioneira por microrganismos (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis*), que crescem rapidamente formando colônias envoltas por matriz extracelular de polissacarídeos. Em aproximadamente 2 ou 3 semanas, devido à heterogeneidade das bactérias, este biofilme chega ao seu grau máximo de desenvolvimento, denominado comunidade clímax (Zanin et al.³⁷, 2003). A maturação do biofilme se torna oportuna pelo fato da superfície dentária ser dura, podendo assim se localizar supra ou subgengivalmente (Zanin³⁶, 2005).

Quando ocorre um desequilíbrio no ecossistema do biofilme dentário, como por exemplo aumento na frequência e ingestão de sacarose (carboidrato fermentável), ocorrerá aumento do desenvolvimento de algumas espécies de bactérias sacarolíticas acidúricas e acidogênicas, como os *Streptococcus* do grupo *mutans* (Alakker, Memarzadeh¹, 2014; Zanin et al.³⁷, 2003) e outras espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus*, que levam à produção de ácidos, principalmente o láctico, havendo assim a dissolução do fosfato de cálcio da camada superficial da estrutura dentária, liberando cálcio e fosfato para a cavidade oral (Marcotte, Lavoie¹⁷, 1998). Logo, leva a queda de pH, que com a ação do tempo, ocorrem sucessivas desmineralizações do esmalte, fazendo com que a lesão de cárie avance para a dentina, e caso

esse progresso continue e não seja interrompido, pode haver a destruição completa e, conseqüentemente, a perda do elemento dentário (Loesche¹⁴, 1993).

O tratamento da doença cárie no seu estágio inicial consiste na remoção mecânica e química do biofilme bacteriano, eliminando assim, de maneira preventiva, os microrganismos cariogênicos, principalmente *Streptococcus mutans*, no aumento da resistência dental, por meio da aplicação de selante por profissionais, e na aplicação tópica de flúor, bem como a modificação da dieta (Van Houte³², 1994). E quando em estágio mais avançado como a presença de cavitações, o tratamento consiste na remoção da estrutura dentária infectada e realização de restaurações (Soukos, Goodson³⁰, 2011).

A remoção mecânica do biofilme dentário é o método mais aceito, já que a higienização bucal ineficiente, associada à presença do biofilme dental, são fatores relacionados à causa da doença cárie (Alves et al.², 2009). Entretanto, alguns indivíduos apresentam dificuldade na remoção mecânica do biofilme ou até mesmo, não possuem motivação para realizá-la, sendo, por isso, necessário associar ao método mecânico, o químico por meio do uso complementar de substâncias antimicrobianas ou antibióticos (Pereira et al.²³, 2006; Zanin³⁶, 2005). Infelizmente, o uso frequente destas substâncias pode levar à seleção de espécies resistentes (Zanin³⁶, 2005).

Atualmente, a solução antimicrobiana mais utilizada ainda é a clorexidina que tem sido utilizada para limpar as cavidades dentárias infectadas antes destas serem restauradas, para reduzir ou impedir a incidência de cáries recorrentes, como solução irrigadora durante um tratamento endodôntico, na forma de bochecho, assim como para promover a desinfecção na fase pré e pós operatória em cirurgias (Santin et al.²⁷, 2014). Atua na diminuição dos níveis de *Streptococcus mutans* (Santin et al.²⁷, 2014), altera o arranjo das bactérias do biofilme dental, e, assim, resulta na redução imediata do número de bactérias salivares devido seu amplo espectro, quando neste caso utilizada na forma de bochecho (Pereira et al.²³, 2006), devido à uma propriedade denominada substantividade, no qual a molécula permanece aderida aos tecidos, promovendo atividade antimicrobiana por até 12 horas (Santin et al.²⁷, 2014). Atua em bactérias gram positivas e negativas, tanto aeróbias quanto anaeróbias, fungos e leveduras (Franco et al.⁹, 2007). Porém, a clorexidina apresenta alguns efeitos colaterais que perduram por mais de 14 dias, como: alteração no paladar, sensação de queimação, coloração dos dentes e restaurações, aumento da formação de cálculo e, mais raramente, descamação do epitélio oral (Arweiler et al.⁵, 2002; Paschoal et al.²¹, 2013; Santin et al.²⁷, 2014).

Justamente, em função da quantidade de microrganismos presentes na cavidade oral, pelos problemas apresentados pela clorexidina e também devido à resistência desenvolvida

pelas bactérias em função do uso frequente e impróprio de antibióticos, se faz necessário o uso de técnicas terapêuticas antimicrobianas alternativas para o controle do crescimento microbiano, afim de suprimir a doença de forma conservadora. É neste contexto que entra a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) (Silva²⁹, 2012).

A terapia fotodinâmica surgiu como forma de tratamento antimicrobiano não invasivo para infecções causadas por bactérias, fungos e vírus (Jori et al.¹², 2006). Ao associar uma substância fotossensibilizadora com a luz em comprimento de onda ressonante, no tratamento contra microrganismos, a terapia passa a se chamar de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), de maneira que as aplicações não desenvolvem resistência microbiana (Muller¹⁸, 2006; Silva²⁹, 2012; Tennert et al.³¹, 2015). Outras características que tornam a terapia fotodinâmica vantajosa, é o fato da morte celular ser rápida e mediada por radicais livres que acaba por não desenvolver resistência por parte do microrganismo, a morte celular se restringe a área irradiada (Dovigo et al.⁸, 2011; Zanin³⁶, 2005), alta especificidade do alvo (Jori et al.¹², 2006) e não causa efeitos colaterais como a clorexidina (Araújo et al.⁴, 2012).

Em 1993 iniciaram-se os estudos da aplicação da terapia fotodinâmica nas bactérias causadoras da doença cárie, onde se observou que tais bactérias eram sensíveis à luz Laser associada a fotossensibilizador, e no ano subsequente, alguns autores observaram reduções significativas destas bactérias cariogênicas utilizando a TFDA (Burns et al.⁷, 1994; Loesche¹⁴, 1993).

Na terapia fotodinâmica podem ser utilizados vários tipos de fontes de luz, como os Lasers, LEDs, luz halógena, entre outros, sendo que o comprimento de onda deve estar sempre em ressonância com o fotossensibilizador a ser utilizado (Giusti et al.¹⁰, 2008; Paulino et al.²², 2005).

O Laser, cuja sigla em inglês significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, tem ganho espaço na Odontologia com o intuito de reduzir o número de microrganismos que venham a causar patologias na cavidade oral, (Muller¹⁸, 2006) principalmente as bactérias que estão envolvidas na doença cárie e doença periodontal, (Zanin et al.³⁷, 2003) por apresentar características como monocromaticidade (comprimento de onda bem definido), coerência (as ondas dos fótons que compõem o feixe estão em fase) e colimação (a radiação propaga-se como um feixe de ondas praticamente paralelas) (Muller¹⁸, 2006).

Especificamente o Laser de baixa intensidade apresenta potência ao redor de 30 à 100 mW, comprimento de onda que varia entre 630 e 904 nm, efeito térmico insignificante, sua aplicação depende da quantidade de luz absorvida, (Muller¹⁸, 2006) sua ação é restabelecer o

equilíbrio biológico das células, apresenta ação analgésica e anti-inflamatória sobre os tecidos (Zanin et al.³⁷, 2003) e associado à um fotossensibilizador leva à morte dos microrganismos (Yamada et al.³⁵, 2004).

A fonte de luz vermelha, que opera entre 630 e 700 nm, tem sido muito utilizada na TFDA, pois apresenta comprimento de onda longo, que facilita a difusão da luz por tecidos biológicos (Wilson et al.³⁴, 1992). Assim, a interação entre essas fontes de luz vermelha e um fotossensibilizador que absorva a luz neste comprimento de onda, como o azul de metileno (AM), promove morte bacteriana significativa (Rolim et al.²⁶, 2012).

A eficácia da fonte de luz depende do comprimento de onda, dose de energia, potência/fluência de energia e da quantidade de oxigênio resultante da combinação do fotossensibilizador e da fonte de luz (Santin et al.²⁷, 2014).

O fotossensibilizador se faz necessário para que este penetre e se fixe na parede das bactérias e possa atrair para si a luz da fonte utilizada (Zanin et al.³⁷, 2003), promovendo, dessa forma, a morte bacteriana (Yamada et al.³⁵, 2004), por meio da produção dos radicais que são fundamentais para os fotoprocessos (Zanin et al.³⁷, 2003). Assim, quando as bactérias apresentam-se coradas com o fotossensibilizador, são irradiadas e absorvem os fótons da fonte de luz e, conseqüentemente, os elétrons ficam excitados e passam para um nível de energia superior. Neste momento, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular e formar uma molécula altamente reativa, o oxigênio singleto, denominada de fotoprocessos tipo II, ou agir com outras moléculas e produzir hidroxilas e radicais livres, ocorrendo o fotoprocessos tipo I. Os produtos dos fotoprocessos I e II levam à morte bacteriana (Yamada et al.³⁵, 2004; Zanin³⁶, 2005; Zanin et al.³⁷, 2003). Contudo, nem toda substância capaz de atrair a luz para si, será denominada de fotossensibilizador, pois para ser eficaz na morte bacteriana, esta substância deve apresentar algumas características como baixa toxicidade local na ausência ou presença de luz, (Rolim et al.²⁶, 2012) absorver luz em comprimento de onda adequado (Muller¹⁸, 2006), não trazer danos tóxicos ao hospedeiro (Zanin³⁶, 2005), apresentar elevada afinidade de ligação com microrganismos (Soukos, Goodson³⁰, 2011), conservar-se no estado excitado por tempo considerável para que haja a interação com moléculas adjacentes e produzir produtos com toxicidade suficiente para causar a morte bacteriana (Zanin et al.³⁷, 2003).

No que diz respeito à morte bacteriana, esta é dependente das estruturas constituintes da parede celular das bactérias gram positiva e gram negativa, na qual as bactérias gram positivas são sensibilizadas pela formação do oxigênio singleto ou radicais livres e as

bactérias gram negativas por um fotossensibilizador que consiga romper a membrana celular (Muller¹⁸, 2006).

As bactérias gram positivas são mais susceptíveis à terapia fotodinâmica, pois apresentam parede celular com única camada espessa, que é ocupada em sua maior parte por substância peptídeoglicana que lhe confere rigidez e permite inúmeras interligações. Apresentam como componentes, ácidos teicóicos e lipoteicóicos que facilitam a ligação e regulação de entrada e saída de cátions das bactérias (Muller¹⁸, 2006; Perussi²⁴, 2007).

Já as gram negativas, são mais resistentes à terapia fotodinâmica e apresentam em sua parede celular várias camadas, com poucas substâncias peptídeoglicanas e, conseqüentemente, menos interligações, e uma membrana externa, havendo entre estas o periplasma, que é composto por enzimas hidrolíticas e enzimas que inativam drogas. Não apresentam ácidos teicóicos e a principal proteína da membrana externa é a porina, que apresenta permeabilidade parcialmente seletiva (Muller¹⁸, 2006; Perussi²⁴, 2007).

Durante a inativação das bactérias, com a TFDA podem ocorrer danos em sua membrana celular (Muller¹⁸, 2006) e danos no DNA (Soukos, Goodson³⁰, 2011). Entretanto, na aplicação da TFDA, nos deparamos com um problema, pois existem diferenças na sensibilidade entre espécies de mesma classificação gram, como por exemplo na permeabilidade da membrana, tamanho da célula, enzimas antioxidantes que variam em cada espécie e diferentes mecanismos de reparo no DNA (Silva²⁹, 2012).

Diversos fotossensibilizadores já foram testados, tanto na área médica quanto na odontológica. No tratamento de tumores, derivados porfirínicos de primeira geração, clorinas e ftalocianinas de segunda geração e até agentes fototerapêuticos endógenos, como o ALA (Machado¹⁶, 2000) são utilizados. Na Odontologia, vários estudos mostraram a eficiência do azul de toluidina O (TBO), azul de metileno (Zanin et al.³⁷, 2003) e curcumina (Araújo et al.⁴, 2012; Yamada et al.³⁵, 2004). Por isso, os derivados de fenotiazina, como o azul de metileno e azul de toluidina, são os fotossensibilizadores mais utilizados na Odontologia (Muller¹⁸, 2006; Longo et al.¹⁵, 2010).

O azul de metileno, é utilizado como agente de fotossensibilização desde a década de 1920, para detectar lesões pré malignas da mucosa, como marcador, e apresenta-se muito eficiente em bactérias gram negativas porque consegue passar entre os canais de porina (proteína), e isso se deve à sua hidrofiliçidade, ao seu baixo peso molecular e a sua carga positiva (Soukos, Goodson³⁰, 2011). Pertence ao grupo dos fenotiazínicos, apresenta máxima absorção na região do vermelho visível (Silva²⁹, 2012), é um corante orgânico, aromático, heterocíclico e é solúvel em água ou álcool (Poggere et al.²⁵, 2011).

Modificações em diferentes fotossensibilizadores vêm sendo propostas com o objetivo de aumentar sua eficiência e rendimento fotodinâmico. Dentro deste contexto, o composto químico nitrato de sódio vem sendo investigado por alguns autores (Horn, Morgenroth¹¹, 2006; Schlag et al.²⁸, 2007; Vatansever et al.³³, 2013).

O nitrato de sódio tem chamado a atenção dos pesquisadores pois pode ser utilizado como captador de elétrons em cadeias anaeróbicas e é relevante no processo anóxico em biofilmes, na qual a enzima nitrato-redutase respiratória se liga à membrana, se reduz a nitrito e sob condições anaeróbicas pode ainda se reduzir a amônio, provocando uma resposta ao estresse ambiental que ocorre na formação do biofilme, que concomitantemente leva à deficiência do biofilme mediada pela síntese do polissacarídeo adesina intercelular (PIA) (Horn, Morgenroth¹¹, 2006; Schlag et al.²⁸, 2007; Vatansever et al.³³, 2013).

Dessa forma este estudo teve como objetivo associar o fotossensibilizador azul de metileno com nitrato de sódio, para que possamos aumentar a sua eficiência na terapia fotodinâmica antimicrobiana quando aplicada em biofilmes orais (TFDA).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia fotodinâmica tem sido amplamente utilizada na odontologia para o tratamento de várias doenças, entre elas a doença cárie ² e tem demonstrado um eficaz efeito antibacteriano ²⁹.

O tratamento da doença cárie consiste na remoção mecânica e química, quando em estágio inicial ³² e quando em estágio mais avançado com a presença de cavitações, o tratamento consiste na remoção da estrutura dentária infectada ³⁰, de tal maneira que os microrganismos sejam removidos devido a impossibilidade de remineralização, e em áreas que são passíveis de remineralização, estas devem ser mantidas ^{20,38}. No entanto, a remoção precisa destas áreas que não são mais passíveis de remineralização, se torna muito difícil, havendo o risco de exposição pulpar ^{6,7}. Com a terapia fotodinâmica antimicrobiana, devido a morte bacteriana se dar por meio da formação de espécies reativas de oxigênio e se restringir a área irradiada, o risco de exposição pulpar pode ser evitado e ainda, não existe possibilidade de resistência bacteriana ^{8,36}.

Visando reduzir os microrganismos presentes na cavidade oral, a clorexidina tem sido amplamente utilizada como solução antimicrobiana para limpar as cavidades dentárias infectadas antes de serem restauradas, além de outras funcionalidades ²⁷, pois atua em todos os tipos de bactérias, além de fungos e leveduras ⁹. Porém, apresenta inúmeros efeitos colaterais ^{5,21,27}.

Desta forma, a terapia fotodinâmica tem apontado com o intuito de promover a descontaminação geral da cavidade oral ¹⁹. No entanto, visando melhorar o potencial da terapia fotodinâmica contra os microrganismos causadores da doença cárie, estratégias antimicrobianas vêm sendo propostas, como a modificação de fotossensibilizadores.

Assim, este trabalho se propôs à associar o fotossensibilizador azul de metileno com nitrato de sódio. Em cultura planctônica de *Streptococcus mutans* o fotossensibilizador associado ao nitrato de sódio quando irradiado pela fonte de luz Laser, resultou em completa eliminação dos microrganismos nas concentrações entre 0,625 e 5 µM, quando comparado ao fotossensibilizador não associado que apresentou reduções de até 4 logs nas concentrações de 2,5 e 5 µM. Enquanto que no biofilme a associação do fotossensibilizador resultou em reduções entre 2,13 log₁₀ e 2,37 log₁₀ para as concentrações de 2,5 e 5 µM, e para o fotossensibilizador não associado resultou em reduções de 1,78 e 1,68 log₁₀ para as mesmas concentrações.

Analisando ambos os resultados, pode-se concluir que a associação de fotossensibilizadores pode ser uma maneira viável para redução ou eliminação de microrganismos presentes na cavidade oral, principalmente os causadores da doença cárie. No entanto, muitos estudos ainda devem ser realizados visando padronizar os parâmetros para que a terapia fotodinâmica seja aplicada clinicamente e ainda, seja eficiente em biofilmes, visto que a maioria das doenças que acometem a cavidade oral, como a doença cárie, doença periodontal, candidíase, entre outras ³⁰, são resultantes da organização dos microrganismos na forma de biofilme, o que dificulta o sucesso dos tratamentos, devido os biofilmes serem estruturas muito complexas ¹³.

Referências*

1. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43: 95-104.
2. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira SMV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(2): 222-4.
3. Amaral RR, Amorim JCF, Nunes E, Soares JA, Silveira FF. Terapia Fotodinâmica na Endodontia – Revisão de Literatura. *RFO*. 2010; 15(2): 207-11.
4. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30(2): 96-101.
5. Arweiler NB, Auschill TM, Reich E, Netuschil L. Substantivity of toothpaste slurries and their effects on reestablishment of dental biofilm. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(7): 615-21.
6. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J*. 2000; 188: 476–82.
7. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. *J Dent*. 1994; 22(5): 273-78.
8. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43: 927-934.
9. Franco APGO, Santos FA, Martins GC, Pilatti G, Gomes OMM, Gomes JC. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *UEPG Ci Biol Saúde*. 2007; 13(1/2): 53-8.
10. Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmerson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light – emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26(4): 281-7.
11. Horn H, Morgenroth E. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chem Eng Science*. 2006; 61: 1347-56.
12. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(5): 468-81.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Int J Bacteriol*. 2008; 190(13): 4632-40.
14. Loesche WJ. Cárie dental: uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura médica; 1993.
15. Longo JPF, Azevedo RB. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. *Rev Clín Pesq Odontol*. 2010; 6(3): 249-57.
16. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Qim Nova*. 2000; 23(2): 237-43.
17. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1): 71-109.
18. Muller F. Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias gram-positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizantes [Dissertação]. São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba; 2006.
19. Núñez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. PDT – Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
20. Ogushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res*. 1975; 54(5): 1019-26.
21. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VV, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10: 313-319.
22. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr.G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivation *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(3): 353-9.
23. Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF et al. Efeito Antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(1): 88-93.
24. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Qim Nova*. 2007; 30(4): 988-94.
25. Poggere PA, Davis R, Montanher SF, Lobo VS. Azul de Metileno: Propriedades e Tratamentos. In: Anais do III ENDICT- Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica; 19-21 out 2011; Toledo, PR. Toledo: Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR; 2011. P. 1-7.

26. Rolim JPML, de-Melo MAS, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NAP et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. J Photochem Photobiol B. 2012; 106: 40-6.
27. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, Borsatto MC, Corona SAM. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the Literature. Sci World J. 2014; 2014: 1-14.
28. Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Gotz F. Inhibition of Staphylococcal biofilm formation by nitrite. J Bacteriol. 2007; 189(21): 7911-9.
29. Silva MP. Terapia fotodinâmica em esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2012.
30. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol. 2000. 2011; 55(1): 143-66.
31. Tennert C, Drews AM, Walther V, Altenburguer MJ, Karyggiani L, Wrbas KT et al. Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015, 12(2): 244-51.
32. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res. 1994; 73(3): 672-81.
33. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A et al. Review article: antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiol Rev. 2013; 37: 955-89.
34. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiations. Curr Microbiol. 1992; 25(2): 77-81.
35. Yamada Júnior AM, Hayek RRA, Ribeiro RS. O emprego da terapia fotodinâmica na redução bacteriana e periodontia e implantodontia. RGO. 2004; 52(3): 207-10.
36. Zanin ICJ. Estudo da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais [Tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
37. Zanin ICJ, Brugnera Junior A, Zanin F, Gonçalves RB. Terapia fotodinâmica na odontologia (T.F.D.). RGO. 2003; 51(3): 179-82.

38. Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(2): 124-32.