



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

MAÍRA TERRA GARCIA

**CLORINA COMO FOTOSSENSIBILIZADOR PARA TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE *Streptococcus mutans***

2018

MAÍRA TERRA GARCIA

**CLORETO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR PARA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE *Streptococcus mutans***

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, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Garcia, Maíra Terra
Clorina com fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica sobre
Streptococcus mutans / Maíra Terra Garcia. - São José dos Campos : [s.n.],
2018.
66 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, 2018.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira
Coorientadora: Juliana Ferreira Strixino

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Dra. Natalia Mayumi Inada

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Física de São Carlos

Campus de São Carlos

Profa. Adj. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 4 de maio de 2018.

DEDICATÓRIA

A minha avó Edile Calciolari Garcia (*in memoriam*)

E quando um bem-te-vi cantar
É de você que meu coração vai lembrar

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira**, não só por me aceitar como orientanda, mas por toda a sua dedicação não só comigo, mas com todos do laboratório, obrigada por me guiar e me ajudar a chegar no fim desse sonho da melhor forma possível. Agradeço pela sua confiança no meu potencial, que fez querer dar o meu melhor sempre. Olhando para trás vejo o quanto amadureci nesta jornada, não há palavras para que expresse o quanto sou grata a você, não só por todos os momentos bons que conquistamos juntas nesses últimos anos, mas também por todas as vezes que você, mesmo com esse seu jeito doce de dar "broncas", me fez sair da minha zona de conforto, me mostrando que poderia ir além e ser mais do que imaginava. Espero muito que todo meu empenho em todos os projetos que me envolvi tenha atendido suas expectativas e peço desculpa pelos que deixei a desejar. Te admiro muito como pessoa, como professora e ainda mais como orientadora. Se hoje sou uma pessoa mais madura tanto na vida profissional quanto pessoal muito é graças a você, por tudo isso e mais um monte de outras coisas, mais uma vez meu muito obrigada.

À minha Co-orientadora **Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino** por sempre manter a porta da UNIVAP aberta para mim, por esclarecer a todo momento as minhas dúvidas, que não foram poucas, de forma tão solícita e com uma paciência inigualável, obrigada por me ajudar a ver o quão incrível a TFD é, e por ter um papel tão importante nesse meu pequeno grande sonho.

À minha Tia **Islene Calciolari Garcia** e ao meu tio **Alexandre Oliva**, por terem acreditado em mim quando eu mesma duvidei, por terem me dado não só todo o suporte escolar, mas também todo o carinho e atenção todas as vezes que precisei, de certa forma me sinto filha de vocês também e agradeço por vocês estarem presentes em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais **Jônatas Calciolari Garcia** e **Carla Oliveira Terra**, por terem sido pais presentes, por terem me dado todo o amor desse mundo e principalmente por terem me ensinado que errar faz parte e se caiu é só levantar. A você pai um agradecimento especial não só por ser esse PAI, mais por ter participado tão ativamente desse título, seja pintando estante de tubo, furando tampa de pote de *Galleria mellonella* ou até mesmo indo comprar mel de qualidade para a ração delas, meu muito obrigada mesmo por tonar essa jornada mais leve.

A minha irmã **Tainã Terra Bossi**, meu irmão **Gabriel Terra Garcia** e minha prima-irmã **Larissa Garcia Oliva** por serem meu suporte, tudo isso é por vocês e para vocês, cada aperto no coração de saudade vale a pena quando vejo o brilho no olhar de vocês ao ouvir vocês falando do meu mestrado. Eu amo muito vocês.

Ao meu marido **Marcelo Pilatti Mendes da Silva**, que me aguentou nos momentos mais difíceis desse caminho, que cuidou de mim, que me deu todo o suporte para realizar esse sonho, sem em momento nenhum me cobrar algo em troca, sei que esses últimos anos não foram fáceis e agradeço a você por não ter desistido de nós em momento nenhum. Obrigada por ser meu marido, meu amigo, meu cúmplice, sempre andando lado a lado comigo, desde nossa adolescência, eu te amo e sempre estarei ao seu lado.

À minha família por completo, cada um teve um papel importante nessa jornada, mas em especial ao meu avô **Mauricy Airton Terra** e minhas avós **Terezinha Aparecida Oliveira Terra** e **Dorothea Castagnari** por toda ajuda, carinho e apoio ao longa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Unesp- Universidade Estadual Paulista do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos meu muito obrigada.

Ao Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, por ser tão paciente e estar disponível para me ajudar a todo momento, por sempre passar de forma dedicada e com amor todo o seu conhecimento.

À Profa. Adj. Ana Lia Anbinder, talvez você nem imagine o quanto eu te admiro, provável que nunca tenha passado pela sua cabeça o quão importante você vem sendo nessa minha formação, mas quero agradecer a você por todos os puxões de orelha dados nas reuniões gerais que você realizou, sei que eles eram para todos, mas para mim foram de extrema importância, espero um dia ter um pouco que seja da garra que você tem. Meu muito obrigada, por você ser simplesmente quem você é.

Ao Corpo docente do programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, por me acolherem e estarem sempre dispostos a me ajudar

As minhas amigas de laboratório **Lívia, Janaína, Jéssica, Damara, Marisol, Thais e Pamela** por serem minha família aqui em São José dos campos e por me aguentarem nos meus melhores e piores dias, levarei vocês comigo sempre.

Ao André e a Mirian, por serem sempre tão solidários e companheiros, sou muito grata por essas amizades que a parceria do mundo da pesquisa me proporcionou.

As minhas amigas da patologia **Thais, Aline e Raquel**, por tornarem meus dias, quase madrugada, muito mais alegres, sem vocês isso aqui não teria tido a mesma graça.

A **Mariana** da Faculdade são Leopoldo Mandic por toda ajuda, amizade, e incentivo, muito obrigada de coração.

Aos meus amigos de vida **Eduardo Mahfoud, Yago Collares, Beatriz Collares e Natasche Annunciato** por estarem sempre comigo independente de que caminho a vida tomar, nós sempre seremos nós.

À **Patrícia Pimentel** por toda a ajuda na parte de biologia molecular, por cessar todas as minhas dúvidas e sempre estar disponível e pronta para ajudar.

A todos os colegas de trabalho, por todo o carinho do dia-a-dia por sempre nos ajudarem, e estarem presentes em todas as etapas dessa jornada.

Aos **Funcionários da Secretaria de Pós-Graduação**, vivemos momentos intensos no preenchimento a plataforma sucupira, e fiquei muito feliz em poder conhecer melhor cada um de vocês, meu muito obrigada por toda ajuda.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa Espacial (INPE) principalmente ao **Evaldo Corat** e ao **João Paulo Machado** por toda ajuda nos testes de MEV e AFM.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora**, por cederem a permissão de eu usar todos os equipamentos necessários para fazer as amostras de dente bovino, em especial a **Profa. Adj. Alessandra Buhler Borges**, por me ajudar na coleta das cepas clínicas e esclarecer todas as minhas dúvidas.

À **FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo** pela bolsa que proporcionou a oportunidade de realização do mestrado (**nº de processo 2016/09296-8**).

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua
melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da
prudência, o seu irmão mais velho e a esperança, o seu
anjo da guarda” Joseph Addison

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.1.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Comitê de Ética.....	23
3.2 Micro-organismos	23
3.2.1 Ativação da cepa padrão de <i>S. mutans</i>	23
3.2.2 Seleção dos pacientes e coleta do material.....	23
3.2.3 Identificação das cepas de <i>S. mutans</i>	24
3.3 Fotossensibilizador e Fonte de luz	25
3.4 Ação da Terapia Fotodinâmica em culturas planctônicas de <i>S. mutans</i> ...	26
3.4.1 Preparo da suspensão de <i>S. mutans</i>	26
3.4.2 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	26
3.4.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL).....	27
3.5 Ação da Terapia Fotodinâmica sobre biofilme de <i>S. mutans</i> em esmalte bovino.....	28
3.5.1 Confeção dos corpos-de-prova de dente bovino	28
3.5.2 Formação dos biofilmes de <i>S. mutans</i> sobre os corpos -de -prova de dentes bovinos	30
3.5.3 Fotossensibilização do biofilme de <i>S. mutans</i>	31
3.5.4 Análise dos biofilmes por meio da contagem do número de células viáveis (UFC/mL)	32
3.5.5 Análise dos biofilmes de <i>S. mutans</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
3.6 Analise da absorção de Fotossensibilizador pelas células de <i>S. mutans</i> .	33

3.7 Análise dos resultados obtidos	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Isolamento e identificação das cepas clínicas de <i>S. mutans</i>	35
4.2 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de <i>S. mutans</i>	37
4.3 Ação da terapia fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> por meio da contagem de células viáveis (UFC/mL)	46
4.4 Analise Ação da terapia fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.5 Análise da absorbância dos fotossensibilizadores pelas células de <i>S.</i> <i>mutans</i>	52
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	66

Garcia MT. Clorina com fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) vem se mostrando eficaz na redução de patógenos bucais e diferentes fotossensibilizadores têm sido investigados. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da TFD sobre *Streptococcus mutans* usando dois fotossensibilizadores derivados da Clorina, Photoditazine (PDZ) e Fotoenticine (FTC), associados à irradiação Laser (660nm, 50 mw/cm²). Esses fotossensibilizadores também foram comparados com o Azul de Metileno (AM) que já tem seus efeitos comprovados contra *S. mutans*. Para realização desse trabalho, foram isoladas 11 amostras clínicas de *S. mutans* a partir de pacientes com lesões de cáries ativas. Essas amostras foram identificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida por confirmação em sequenciamento automático. Também foi incluída no estudo uma cepa padrão de referência (*S. mutans* UA159). Os efeitos da TFD foram testados sobre *S. mutans* em culturas planctônicas e sobre biofilmes formados em dentes bovinos. Os resultados foram avaliados pela contagem de células viáveis e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A capacidade dos fotossensibilizadores em penetrar nas células de *S. mutans* foi avaliada por meio da absorbância em espectrofotômetro. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Na identificação das amostras, verificou-se que todas apresentaram o fragmento de 517 pb específico para *S. mutans* e que o sequenciamento demonstrou similaridade de 87% com a cepa de referência. Em culturas planctônicas, todos os fotossensibilizadores reduziram as células de *S. mutans* com diferença significativa em relação ao grupo sem tratamento. O FTC conseguiu atingir 100% de redução tanto para a cepa de referência como para as cepas clínicas. Nos testes em biofilmes, houve redução bacteriana de 4 log para o AM, 6 log para o PDZ e de 5 a 8 log para o FTC. Na cepa padrão de referência, o FTC levou a eliminação total das células de *S. mutans*. Além disso, verificou-se que o FTC foi o fotossensibilizador com maior capacidade de desestruturar o biofilme e penetrar nas células de *S. mutans*. Concluiu-se que os fotossensibilizadores derivados da clorina demonstraram maior atividade antimicrobiana na TFD contra *S. mutans* em relação ao AM, sendo esse efeito mais significativo para o FTC.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Streptococcus mutans*. Clorina e6. Microscopia Eletrônica de Varredura.

Garcia MT. Chlorine as photosensibilizer for photodynamic therapy on Streptococcus mutans [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has been shown to be effective in reducing oral pathogens and different photosensitizers have been investigated. The objective of this study was to evaluate the efficacy of PDT on Streptococcus mutans using two photosensitizers derived from Chlorine, Photoditazine (PDZ) and Fotoenticine (FTC) associated with Laser irradiation (660 nm, 50 mw / cm²). These photosensitizers were also compared to Methylene Blue (AM) that already has its proven effects against S. mutans. To perform this work, 11 clinical samples of S. mutans were isolated from patients with active caries lesions. These samples were identified by the Polymerase Chain Reaction (PCR), for confirmation in automatic sequencing. Also included in the study was a standard standard (S. mutans UA159). The effects of PDT were tested on S. mutans in planktonic cultures and on biofilms formed in bovine teeth. Results of viable cell and Scanning Electron Microscopy (SEM) tests. The ability of the photosensitizers to penetrate the S. mutans cells was evaluated by spectrophotometer absorption. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test. In the identification of the samples, all the presentations of the 517 bp fragment specific for S. mutans and that the sequencing demonstrate similarity of 87% with a reference strain were found. In planktonic cultures, all photosensitizers reduced as S. mutans cells with a significant difference in relation to the untreated group. The FTC achieved a 100% reduction for both the reference strain and the clinical strains. In biofilm tests, there was a 4 log reduction for AM, 6 log for PDZ and 5 to 8 log for FTC. In the standard reference strain, FTC led to the complete elimination of S. mutans cells. In addition, it was found that FTC was the photosensitizer with the greatest capacity to de-structure the biofilm and penetrate S. mutans cells. It was concluded that the photosensitizers derived from chlorine showed a greater antimicrobial activity in PDT against S. mutans in relation to AM, being this effect more significant for the FTC.

Keywords: Photodynamic therapy. Streptococcus mutans. Chlorine e6. Scanning Electron Microscopy

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana é colonizada por uma comunidade microbiana dinâmica e altamente diversificada que consiste em mais de 700 espécies bacterianas (Soria-Lozano et al., 2015). No estado saudável, esta comunidade mantém um equilíbrio por meio das interações sinérgicas ou antagonistas. Perturbação desta homeostase, como higienização inadequada, pode levar a mudanças na composição da microbiota e eventualmente causar doença (Bao et al., 2015).

Os estreptococos são os principais colonizadores de superfícies orais e constituem 70% das bactérias cultiváveis existentes no biofilme dental (Soria-Lozano et al., 2015). *Streptococcus mutans* foram descritos pela primeira vez em 1924 por Clark, que observou por meio de um isolado de lesão de cárie uma morfologia mais ovalada das colônias demonstrando ser um forma mutante de estreptococos (Clarke 1924; de Carvalho et al., 2006). *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva, que fermenta carboidratos provenientes da dieta. São micro-organismos acidogênicos, produzem polissacarídeos extracelulares, sobrevivem em meio ácido, tem capacidade de adesão às estruturas dentárias e são conhecidos como o principal causador de cáries dentárias de fissuras e superfícies lisas (Cheon et al., 2013; Durso et al., 2014; Koo et al., 2010; Manoil et al., 2014).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, invasiva e crônica resultante da dissolução química dos tecidos dentais mineralizados pelos ácidos produzidos quando as bactérias metabolizam carboidratos da dieta (Marsh et al., 2015; Nyvad et al., 2013). A cárie dentária ocorre em todo o mundo afetando 2.430 milhões de pessoas (36% da população mundial), sendo considerada a segunda doença mais comum em crianças (Leal et al., 2017; Vohra et al., 2015). Biofilmes microbianos aderentes as superfícies dos dentes desempenham um papel chave no desenvolvimento da doença, através do metabolismo de hidratos de carbono (predominantemente sacarose), levando à produção de grandes quantidades de ácido lático, e, finalmente, a dissolução da superfície dos dentes.

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos (única ou múltiplas espécies bacterianas) que se aderem a uma superfície sólida, como a superfície dos

dentes na cavidade bucal. Atualmente os biofilmes tem recebido muita atenção devido ao seu impacto na indústria e na medicina, pois são responsáveis por numerosas infecções bucais crônicas, podendo causar outras doenças no organismo humano. Além disso muitas dessas infecções são de difícil tratamento, uma vez que o biofilme constitui um dos mecanismos de sobrevivência dos micro-organismos, por protegê-los da ação de antimicrobianos e das defesas imunológicas do hospedeiro (Ren et al., 2016).

Estudos tem comprovado que o biofilme não é resultado de acréscimo aleatórios de células bacterianas, ao contrário, resulta de uma comunidade de micro-organismos que cooperam para formar estruturas bem diferenciadas (Merritt et al., 2003). *S. mutans* normalmente existe como um membro regular da comunidade do biofilme madura, no entanto, sob certas condições pode tornar-se dominante e assim causar doença (Kreth et al., 2005). A formação de biofilme por *S. mutans* é realizada pelos seus principais fatores de virulência, as glicosiltransferases (GTFS), que sintetizam polissacarídeos extracelulares (PEC) (Ren et al., 2016).

Os biofilmes podem ser reproduzidos em estudo *in vitro* utilizando-se diferentes substratos e técnicas de avaliação, incluindo contagem do número de células viáveis, determinação da massa total pelo peso seco ou medidas da absorbância, quantificação da atividade metabólica usando ensaios de XTT e análise por microscopia eletrônica. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é capaz de criar imagens com aparência tridimensional, o que ajuda avaliar a diferença de estrutura do biofilme entre cada grupo estudado.

Apesar de existirem várias técnicas disponíveis para o controle do biofilme oral, a cárie dentária ainda constitui um problema clínico de grande relevância, por ser uma doença pandêmica, que vem nos acompanhando a milhares de anos. Este fato tem estimulado pesquisas à procurar novas formas de prevenção e tratamento para a cárie dentária (Koo et al., 2010; de Moraes et al., 2017). Dentre as opções que preservam a estrutura dental e são potencialmente eficazes contra os micro-organismos, vem se destacando a terapia fotodinâmica (TFD). Essa terapia tem se mostrando eficaz para reduzir os micro-organismos patogênicos na cavidade bucal, prevenindo e evitando doenças odontológicas até então tratadas de maneira convencional (Panhóca, 2011).

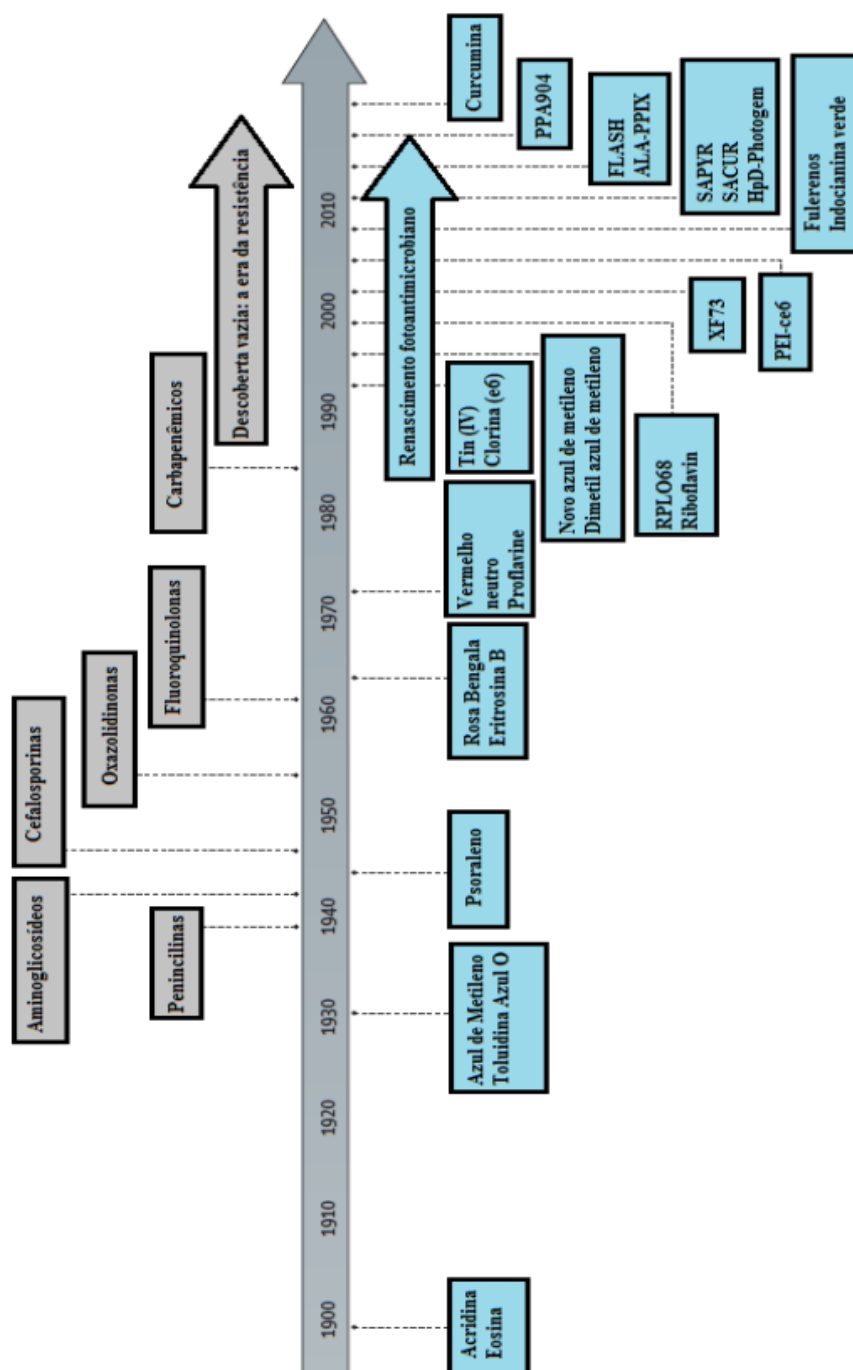
A TFD teve início no século XX, em Munique, quando Oscar Raab e seu

professor Herman von Tappeiner observaram os efeitos decorrentes de fotossensibilização em paramécio (Da Hora Machado, 2000; Issa, Manela-Azulay, 2010), após um pequeno período de descoberta, os estudos com a TFD ficaram estagnados por um longo período, devido a descoberta de antibióticos que se mostravam eficazes para a inibição do crescimento microbiano. Entretanto, após algumas décadas, com o uso indiscriminado desses fármacos, surgiram cepas resistentes, devido a esse fato os estudos com TFD voltaram a despertar o interesse de pesquisadores (Caires et al., 2017), (**Figura 1**). Essa terapia baseia-se em uma reação fotoquímica capaz de causar destruição seletiva de um tecido, utilizando fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular (Issa, Manela-Azulay, 2010). Constitui uma abordagem promissora para erradicar bactérias patogênicas que causam, tanto doenças localizadas como sistêmicas (Garcez et al., 2015).

A TFD tem dupla seletividade, já que o fotossensibilizador pode ser direcionado para o tecido doente, assim como também a luz pode ser precisamente focalizada no local da lesão (Perussi, 2007). Com a excitação eletrônica do fotossensibilizador pela luz faz com que ele passe de um estado fundamental para um estado *triplete* fotoativo, com isso a fotodestruição dos tecidos ou micro-organismos podem ocorrer por meio de uma transferência eletrônica que faz a produção de radicais superóxidos e, em seguida, radicais (mecanismo tipo I) ou por meio da transferência de energia para produzir oxigênio *singlete* excitado, que é altamente citotóxico (mecanismo tipo II), ambos os tipos são espécies de oxigênio altamente reativas (ROS) (Cunha, Ribeiro 2007; Da Hora Machado, 2000; Ribeiro et al., 2007), por isso os dois tipos levam a morte celular e a destruição do tecido doente (Carrera et al., 2016), essa fotodestruição está ilustrada na **Figura 2**.

O oxigênio *singlete* é considerado um dos principais responsáveis pela ação da TFD, as ROS reagem rapidamente com o alvo não específico como membranas celulares e proteínas levando a destruição microbiana, com a morte celular direta (Dovigo et al., 2013; Quishida et al., 2015b).

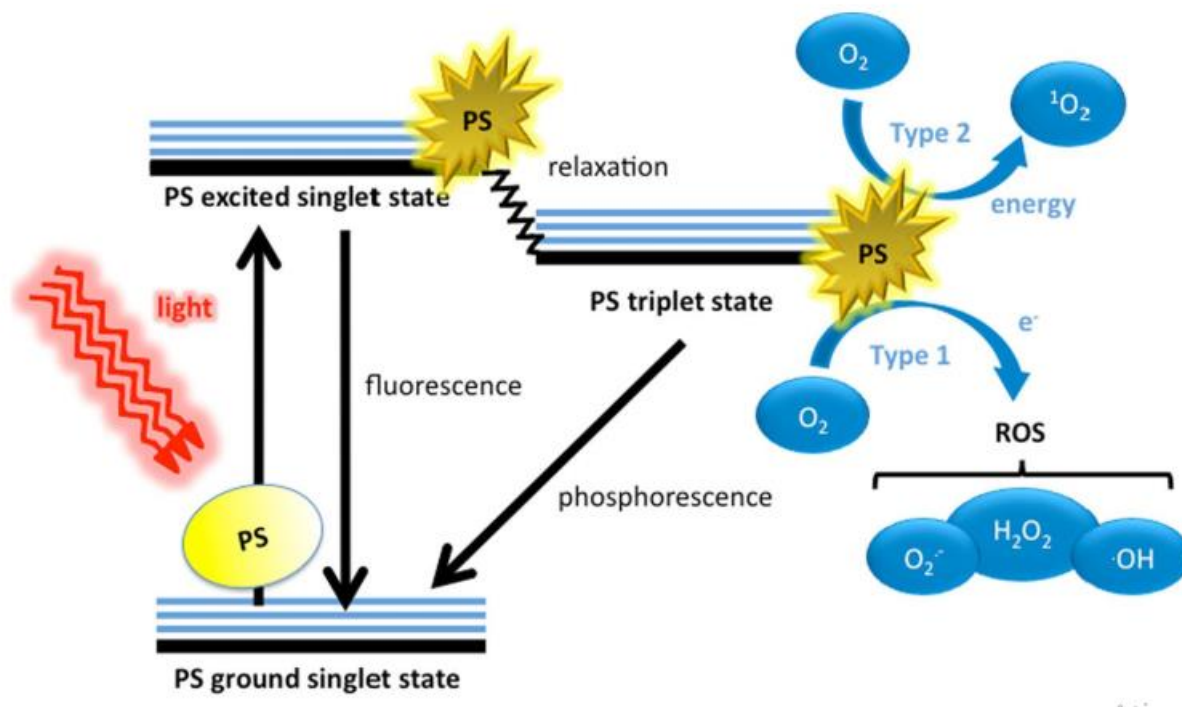
Figura 1-Linha do tempo da evolução dos fotossensibilizadores e antimicrobianos



Legenda: RLP068= Tetracatiônico Zn (II) Cloreto de Ftalocianina. XF73= Porfirina carregada positivamente. PEI-Ce6= Polietilenoimina Clorina (e6) conjugado. SAPYR= derivado de perinaptenoma. SACUR= derivado de Curcumina. HpD-Photogem= Derivado de haematoporfirina. FLASH= derivado de riboflavina catiônico. ALA-PPIX= Protoporfirina IX induzida pelo ácido 5-Aminolevulínico. PPA904= derivado tetrabutilico de Azul de Metileno

Fonte: Caires et al., 2017.

Figura 2- Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da TFD



Fonte: Dai et al., 2012.

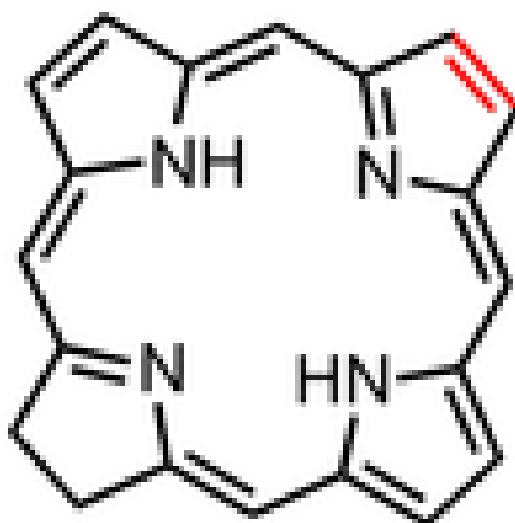
Como a TFD não está ligada a mediações de radicais químicos com ação a um componente específico da célula, o desenvolvimento de cepas resistentes torna-se improvável (Fontana et al., 2009), sendo um ponto bem favorável já que um dos principais problemas atuais em controle bacteriano é a resistência aos antibióticos (Benvindo et al., 2008; Dunbar et al., 2008; Issa, Manela-Azulay, 2010).

Os fotossensibilizadores são classificados em 2 gerações. A 2ª geração surgiu para tentar amenizar alguns problemas que a 1ª geração apresentava como: prolongada sensibilidade cutânea, baixa seletividade pelo tecido tumoral e a banda de absorção é fraca onde a droga é fotoativada, não se encontrando na região ideal do espectro, região do vermelho (Cunha, Ribeiro, 2007). Assim para os novos fotossensibilizadores, algumas características devem estar presentes para ser eleito um fotossensibilizador de 2ª geração: possuir baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, características fotofísicas favoráveis, simplicidade na formulação, farmacocinética favorável, facilidade de análise total dos

componentes da fórmula, alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (Ibanez Simplicio et al., 2002).

A Clorina e₆ é considerada um fotossensibilizador de segunda geração promissor, surgiu em meados dos anos 90, junto com a descoberta da era da resistência microbiana. É pertencente a classe de substâncias terrapirrólicas, sendo derivada da porfirina, possuem um de seus anéis pirrólicos na forma reduzida o que provoca uma alteração na simetria da molécula assim como na sua conjugação (Cunha, Ribeiro, 2007) (**Figura 3**). Possui uma forte absorção na região do vermelho no espectro UV-visível devido ao deslocamento da sua banda Q (Annunzio et al., 2017; Calvete et al., 2009; Pérez-Laguna et al., 2017).

Figura 3- Molécula de Clorina e6



Fonte: <https://it.wikipedia.org/wiki/Clorina>

A Clorina e₆ possui alguns derivados com potencial de ação já conhecido no mercado, como por exemplo: Talaporfin®, Radachlorin® e Photoditazine® (Abdel Gaber et al., 2017), porém o Fotoenticine® é um produto novo no mercado, de origem espanhola que acaba de ser patenteado. Portanto, até onde sabemos, entre as diversas pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo* não existe nenhum trabalho presente na literatura utilizando o fotossensibilizador Fotoenticine para a inativação

de *S. mutans*. Esse fato despertou o interesse por esse projeto de pesquisa, pois as diversas versões de Clorina vem se mostrando ótimos fotossensibilizadores em diversos tratamentos, como cânceres (Cesar, Rosa, 2005), leucoplasias (Pietruska et al., 2014) e redução de micro-organismos em infecções periapicais (Garcez et al., 2015).

Tendo em vista que não existem trabalhos na literatura que testaram a Clorina e₆ como fotossensibilizador na TFD para controle de cárie dentária, o objetivo desse trabalho foi estudar e comparar os efeitos da terapia fotodinâmica mediada por duas classes da Clorina, Photoditazine® e Fotoenticine®, sobre diferentes cepas de *S. mutans*.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da Terapia Fotodinâmica (TFD), mediada pela associação dos fotossensibilizadores derivados da Clorina e₆ e luz no comprimento de onda de 660nm, sobre diferentes cepas de *S. mutans*.

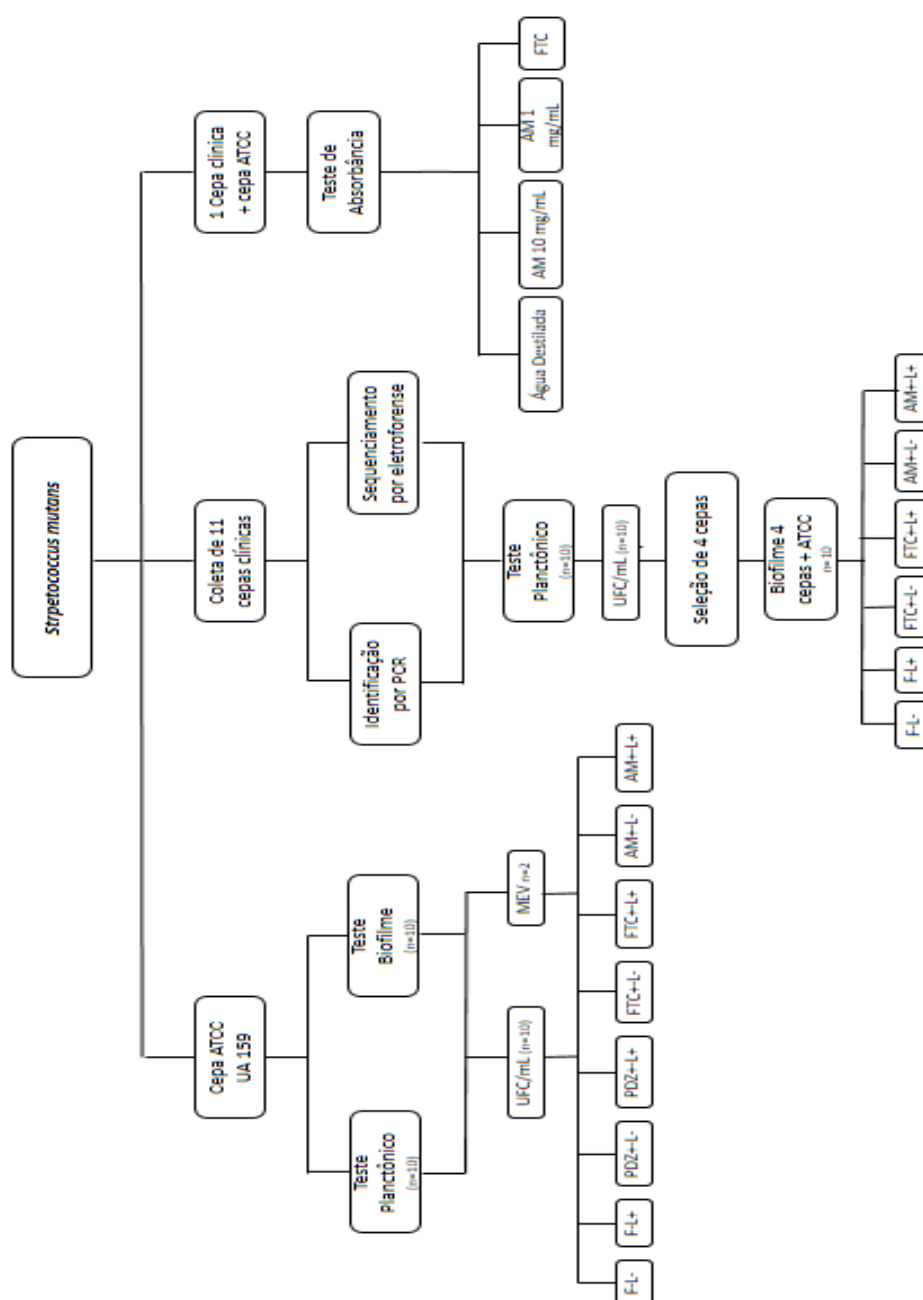
2.1.1 Objetivos específicos

- Isolar e identificar cepas de *S. mutans* de pacientes com lesões de cáries ativas.
- Testar a sensibilidade da cepa padrão e das cepas clínicas de *S. mutans* à TFD em culturas planctônicas e em biofilmes formados na superfície de dentes bovinos.
- Analisar os biofilmes formados por contagem do número de células viáveis e Microscopia Eletrônica de Verredura (MEV).
- Comparar a eficácia da TFD mediada pelos fotossensibilizadores derivados da Clorina com um fotossensibilizador de ação conhecida, o Azul de Metileno.
- Verificar a capacidade de absorção dos fotossensibilizadores pelas células de *S. mutans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes realizados nesse trabalho foram delineados conforme o fluxograma apresentado na **Figura 4**, no qual estão descritos também a divisão dos grupos experimentais e o tamanho da amostra.

Figura 4- Fluxograma demonstrando a distribuição dos testes e grupos experimentais: grupo F-L- (solução fisiológica no escuro), grupo F-L+ (solução fisiológica e laser), PDZ+L- (Photoditazine no escuro), PDZ+L+ (Photoditazine e laser), FTC+L- (Fotoentidine no escuro), FTC+L+ (Fotoentidine e laser), AM+L- (Azul de Metileno no escuro), AM+L+ (Azul de Metileno e laser)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 Comitê de Ética

Esse trabalho foi 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 005611/2017 (ANEXO A).

3.2 Micro-organismos

3.2.1 Ativação da cepa padrão de *S. mutans*

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* (UA159), 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 micro-organismo, a cepa foi cultivada em ágar Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37 °C em estufa Heal force, HF 212 UV (5 % de CO₂).

3.2.2 Seleção dos pacientes e coleta do material

Foram isoladas 11 cepas de lesões ativas de cárie dentária de diferentes pacientes atendidos nas clínicas odontológicas do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/UNESP) sob supervisão da Profa. Adj. Alessandra Buhler Borges. A coleta foi realizada de acordo com a metodologia descrita por de Carvalho et al. (2006) com algumas modificações. Foi utilizado cureta escavadora esterilizada para fazer a remoção do conteúdo da lesão, que foi colocado em tubo Falcon contendo 5 mL de Caldo BHI. As amostras coletadas foram submetidas a 1 min de vibração em agitador de tubo, visando a obtenção de uma suspensão uniforme para a diluição

serial decimal de 10^1 a 10^4 em PBS. A seguir, alíquotas de 25 μ L de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo Agar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (5 %) (MSBS) e todas as placas foram incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48 horas.

3.2.3 Identificação das cepas de *S. mutans*

Para identificação das cepas clínicas, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida por confirmação em sequenciamento automático.

Para extração do DNA, as colônias em MSBS foram suspensas em 180 μ L do tampão de lise contendo 20 mg/mL lisozima, 20 mM tris-HCl, 2mM EDTA e 1,2% Triton X-100, e posteriormente, incubadas a 37 °C por 30 min. O DNA cromossômico foi extraído pelo PureLink® Genomic DNA kit (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante e sua quantificação realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ND-800, Thermo Scientific).

O método de PCR utilizado para identificação da espécie de *S. mutans* foi baseado no protocolo descrito por Oho et al 2000. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 10 a 20 ng de DNA, 10mM Tris HCl pH 8,3/50 nM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,8 mM de desoxirribonucleotideo, 0,3 μ L de cada iniciador (10 μ M/ μ L) e 1 U de Tag Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) no termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação de 95 °C por 30 s, anelamento de 60 °C por 45 s, extensão de 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1,5% em TBE, corados com 0.5 μ g/mL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualizados em transiluminador YV (DyNA Light, LABNET, EUA). Os iniciadores utilizados foram construídos por Oho et al 2000 baseado no gene da enzima glicosiltransferase B (*GTFB*) que participa da síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose e amplificam um fragmento único de 517 pb, específico para *S. mutans*. Em todos os ensaios foram utilizados DNA molde da cepa padrão do *S. mutans* UA

159 como controle positivo e um controle negativo sem adição de DNA molde.

Os fragmentos obtidos foram sequenciados por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 pela empresa Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, MG). A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do software Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltda, South Brisbane, Austrália). Após a edição, as sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank e a detecção de identidade foi feita pelo programa BLAST/ NCBI/ GENE BANK. O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa MAFFT e inspeção visual com auxílio do software Phylogeny.fr (Dereeper et al 2008). Para a análise filogenética foram utilizadas as sequências obtidas dos 11 isolados clínicos de *S. mutans* sequência do gene *GTFB* da cepa padrão UA159.

3.3 Fotossensibilizador e Fonte de luz

Para a realização da fotossensibilização *in vitro* foi seguida a metodologia descrita por Costa et al. (2010). Os fotossensibilizadores derivados da Clorina Fotoenticine® (La empresa Nuevas Tecnologias Cientificas- NTC- Lianera Asturias) e Photoditazine® de origem Russa, foram obtidos por meio da parceria com a Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino, docente e pesquisadora da Universidade do Vale do Paraíba UNIVAP. O Fotoenticine (FTC) veio previamente diluído em n-merilglucamina em concentração inicial de 7,1 mg/mL, já o Photoditazine (PDZ) veio previamente diluído em concentração de 5 mg/mL. O preparo do fotossensibilizador Azul de Metileno, em concentração 1 mg/mL foi realizado por meio da dissolução do pó em PBS. Todos os fotossensibilizadores utilizados no trabalho foram esterilizados por filtração (membrana de 0,22 µm) e armazenados no escuro. A fonte de luz (L) utilizada foi no comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível) na densidade de energia de 15 J/cm² por 5 min. A concentração do FTC, do PDZ e a energia do laser necessárias para alcançar um efeito fotodinâmico significativo foi determinada no teste de culturas planctônicas com cepa padrão de *S. mutans* (UA159).

3.4 Ação da Terapia Fotodinâmica em culturas planctônicas de *S. mutans*

3.4.1 Preparo da suspensão de *S. mutans*

As cepas de *S. mutans* foram incubadas, individualmente, em caldo BHI a 37 °C por 48 h, sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após este período, as células microbianas foram centrifugadas a 1300 xg durante 10 min, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido novamente. As contagens do número de células das suspensões foram realizadas por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 0,398 nm e densidade óptica de 0,620, obtendo-se uma concentração de 10⁶ células/mL de *S. mutans*.

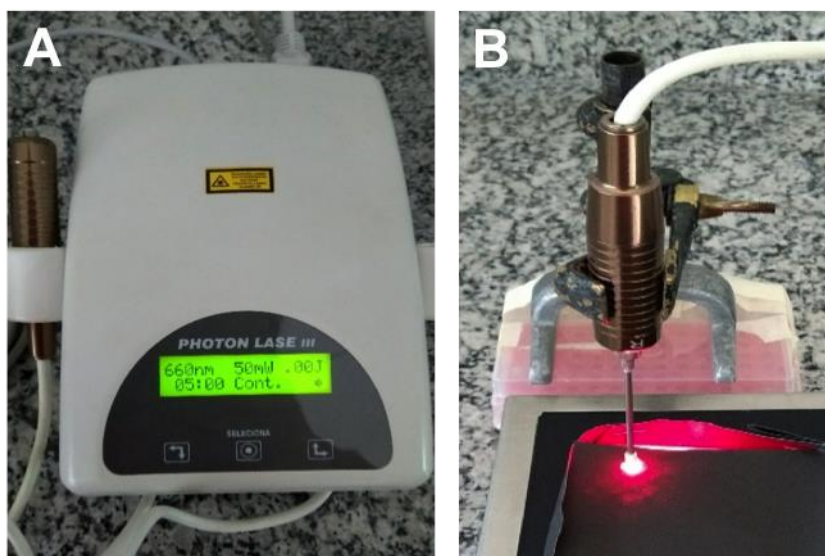
3.4.2 Fotossensibilização *in vitro*

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, foi adicionada em cada poço da placa. Os ensaios foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Grupo controle sem tratamento (F-L-); Aplicação apenas do Laser (F-L+); FTC e irradiação (FTC+L+); Aplicação apenas de FTC (FTC+L-); PDZ e irradiação (PDZ+L+); Aplicação apenas de PDZ (PDZ+L-); Grupo Azul de Metileno e irradiação (AM+L+) e o grupo apenas com Azul de Metileno (AM+L-). Em cada grupo foram realizadas 10 amostras (n=10).

De acordo com as condições experimentais descrita acima, foi adicionado 100 µL de cada fotossensibilizador ou 100 µL de PBS para os grupos sem fotossensibilizador. Resultando em concentrações 0,3 mg/mL para FTC, 0,3 mg/mL do PDZ e 0,5 mg/mL para o AM. As placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a irradiação de luz do ambiente e foram levadas para o agitador orbital (Solab Piracicaba, Brasil) durante 15 min (tempo de pré-irradiação). A seguir, foi

realizada a aplicação do laser (15 J/cm²), com a fibra óptica posicionada na parte superior da placa, com auxílio de um anteparo negro fosco para evitar espalhamento da luz (**Figura 5**).

Figura 5- Aplicação do laser sobre culturas planctônicas de *S. mutans* em placas 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 negro fosco somente com espaço para irradiação da suspensão de *S. mutans* no poço.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)

Após a irradiação, foram preparadas diluições seriadas, e 100 µL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar BHI. Após período de incubação de 48 h a 37 °C sobre condições de microaerofilia foi determinado o número de Unidade Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

3.5 Ação da Terapia Fotodinâmica sobre biofilme de *S. mutans* em esmalte bovino

3.5.1 Confecção dos corpos-de-prova de dente bovino

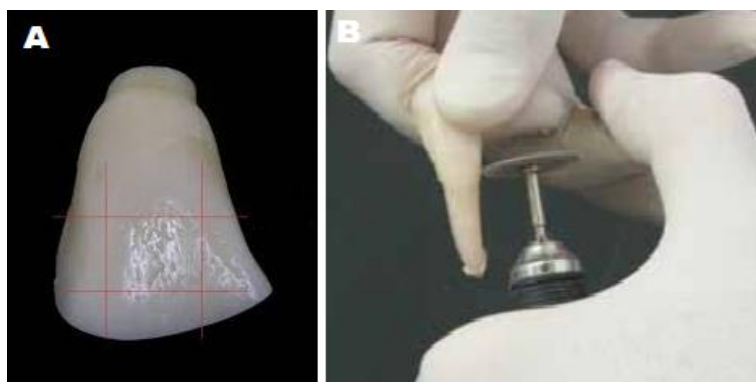
Para confecção dos corpos-de-prova de dentes bovinos foi utilizada a metodologia de Zanin et al. (2006) com algumas modificações. Os corpos-de-prova com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram preparados a partir da parte central de dentes incisivo bovinos.

Inicialmente foi seccionada a raiz da coroa dos dentes com o auxílio de uma peça reta odontológica com disco diamantado (**Figura 6**). As coroas foram então fixadas em um suporte da máquina para corte de amostras circulares, com a face vestibular voltada para cima. Os cortes foram realizados com uma broca trefina de 4 mm internos (**Figura 7**).

Para polimento e padronização das amostras, cada corpo-de-prova foi inserido no interior de uma matriz metálica, com dimensões de 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. A superfície da dentina foi posicionada para o exterior da matriz, sendo então desgastada com lixa de granulação 120 (Fepa-P, Extec, Enfield, CT, USA) em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica, AS, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração em baixa velocidade, sendo sempre conferida sua dimensão final por paquímetro digital (Starret Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (**Figura 8**).

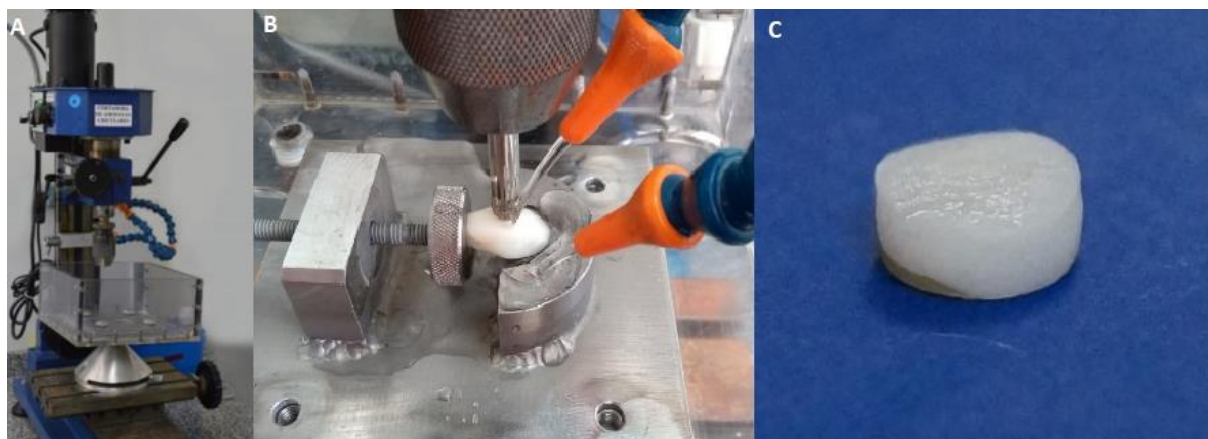
A seguir os corpos-de-prova foram armazenados em 0,1% (v/v) de solução de timol a 4 °C. Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório Integrado de Pesquisa em Odontologia Restauradora (LIPq) do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia no Campus de São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

Figura 6- Seccionamento da raiz dos incisivos bovinos utilizando o disco diamantado



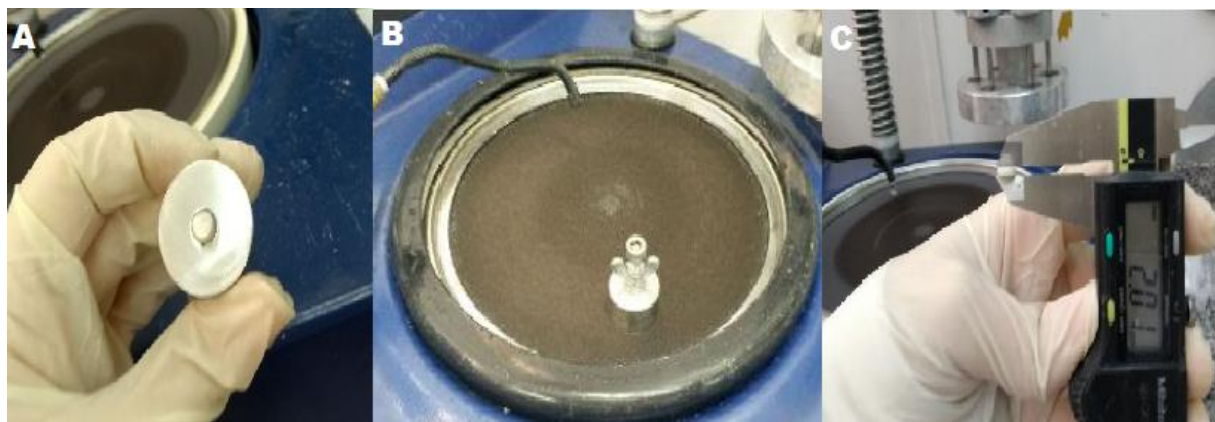
Legenda: A) Ilustração da parte central do dente bovino que foi utilizado para confecção do corpo-de-prova dental; B) Secicionamento da raiz da coroa
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7- Imagens ilustrando o corte dos corpos-de-prova de dentes bovinos



Legenda: A) Máquina de amostras circulares; B) dente em posição para o corte da coroa sobre irrigação para o resfriamento; C) corpo-de-prova seccionado antes do polimento do desgaste da dentina.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8- Polimento dos corpos-de-prova de dente bovino

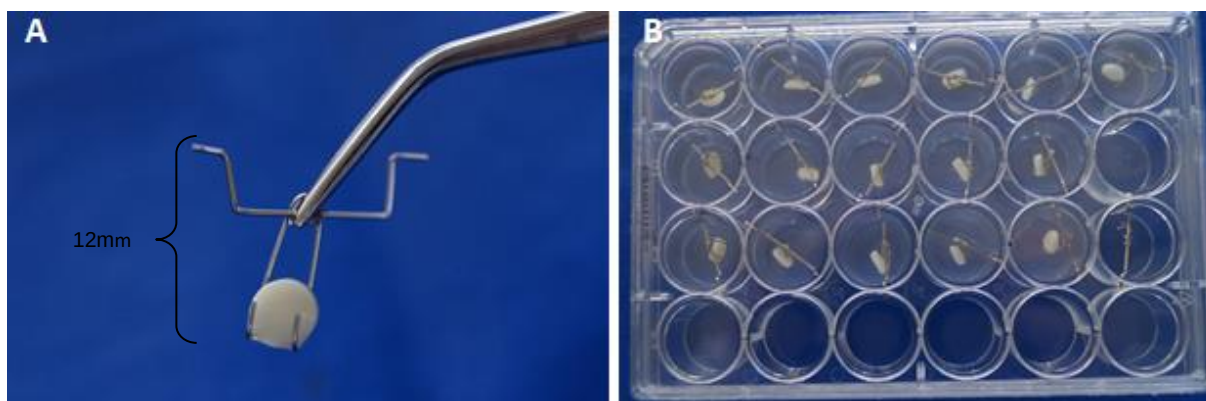


Legenda: A) Matriz metálica com dimensão de 4 mm de diâmetro; B) Politriz circular fazendo o polimento do corpo-de-prova; C) Aferição da espessura do corpo-de-prova no paquímetro
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.2 Formação dos biofilmes de *S. mutans* sobre os corpos-de-prova de dentes bovinos

Os corpos-de-prova autoclavados foram posicionados em placas de 24 poços, suspensos por suportes de 12 mm de altura, confeccionados com fio ortodôntico duro CrNi redondo Ø 0,45 mm (.018”) em rolos e fios ortodônticos Morest Standard CrNi retangular 0,40 mm X 0,55 mm (.016” X .022”) em vareta (**Figura 9**). Com os corpos-de-prova devidamente posicionados foram acrescentados em cada poço 2 mL de saliva artificial e incubados por 4 h a 37 °C. Cada corpo-de-prova foi então transferido para um novo poço contendo 1 mL de caldo BHI com 5% de sacarose e 1 mL de saliva artificial. A seguir, foram adicionados 225 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* (10^8 células/mL) e as placas foram incubadas em microaerofilia a 37 °C por 24 h. Após esse período de incubação, os poços foram lavados três vezes com 2 mL de PBS para a remoção das células fracamente aderidas, e posteriormente foram adicionados mais 1 mL de caldo BHI com 5% de sacarose e 1 mL de saliva artificial. As placas foram novamente incubadas em microaerofilia a 37 °C por mais 24 h.

Figura 9- Suporte de fio ortodôntico e posicionamento dos corpos-de-prova nas placas de 24 poços

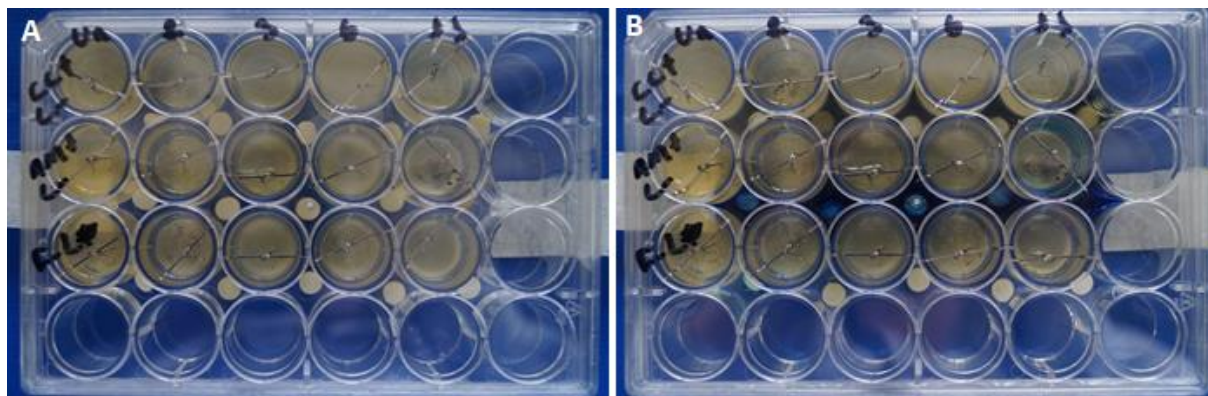


Legenda: A) suporte com 12 mm de altura para dentes confeccionado com fio ortodôntico e soldado com o corpo-de-prova em posição; B) suportes posicionados na placa de 24 poços.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.3 Fotossensibilização do biofilme de *S. mutans*

Após a formação dos biofilmes, os corpos-de-prova foram posicionados na intersecção dos poços da placa de 24 poços, para que fosse possível o uso de uma pequena quantidade de fotossensibilizador (**Figura 10**). Assim, foi adicionado 200 μ L de FTC, PDZ, Azul de Metileno ou PBS conforme o grupo experimental. FTC e PDZ foram usados na concentração de 0,6 mg/mL e o AM na concentração de 1 mg/mL. As placas, foram envolvidas em papel alumínio 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 FTC+L+; PDZ+L+; AM+L+ e F-L+ foram irradiados com laser na densidade de energia de 15 J/cm² por 5 min. Já os grupos FTC+L-; PDZ+L-; AM+L- e F-L- continuaram envolvidos pelo papel alumínio pelo mesmo tempo em que os biofilmes foram submetidos à irradiação.

Figura 10- Posição dos corpos-de-prova para aplicação do fotossensibilizador na área de intersecção dos poços das placas de 24 poços



Legenda: A) Corpos-de-prova na intersecção da placa de 24 poços B) Corpos de prova submersos nos fotossensibilizadores de acordo com cada grupo experimental.

Fonte: Elaborado pelo autor

3.5.4 Análise dos biofilmes por meio da contagem 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 100 μ L foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas durante 48 h a 37 °C sobre condições de microaerofilia. Depois da incubação, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

3.5.5 Análise dos biofilmes de *S. mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a formação do biofilme e tratamento de acordo com cada grupo experimental (F-L-; F-L+; PDZ+L-; PDZ+L+; FTC+L-; FTC+L+; AM+L-; AM+L+), os corpos-de-prova foram tratados com 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por uma hora e a seguir foram desidratados com 1 mL de solução crescente de álcool (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 min e por álcool absoluto por 1 h. As placas contendo os corpos-de-prova foram levadas a estufa a 37 °C por 24 h para a secagem completa das amostras e, posteriormente foram levadas para o Laboratório Associado de Sensores e Materiais LAS/dimare no Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais (INPE) em São José dos Campos/SP.

3.6 Análise da absorção de Fotossensibilizador pelas células de *S. mutans*

Essa análise foi realizada seguindo a metodologia proposta por George e Kishen (2007) com algumas modificações. As cepas de *S. mutans* foram cultivadas em microaerofilia em caldo BHI. As células foram recolhidas na fase estacionária por centrifugação de 1300 xg durante 10 min e foram lavadas com água destilada. A densidade óptica das culturas foram ajustadas para 10^8 células/mL. Após a padronização, 1 mL de cada suspensão foi colocado em tubo Falcon com 1 mL de fotossensibilizador ou água destilada, de acordo com o grupo experimental (Água destilada; AM 1 mg/mL; AM 10 mg/mL e FTC 0,6 mg/mL). Os tubos foram incubados 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 (B582, Micronal, São Paulo, Brasil).

3.7 Análise dos resultados obtidos

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

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação das cepas clínicas de *S. mutans*

Foram obtidos 11 isolados clínicos a partir de lesões de cáries ativas de diferentes pacientes. Os dados registrados na coleta de cada isolado clínico estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1- Dados sobre elemento dentário e classificação das cavidades de cárie de cada isolado clínico

Isolados	Dente	Classe
1	36	III
2	37	I
3	13	III
4	24	V
5	24	III
6	37	II
7	22	I
8	37	I
9	14	III
10	13	V
11	44	V

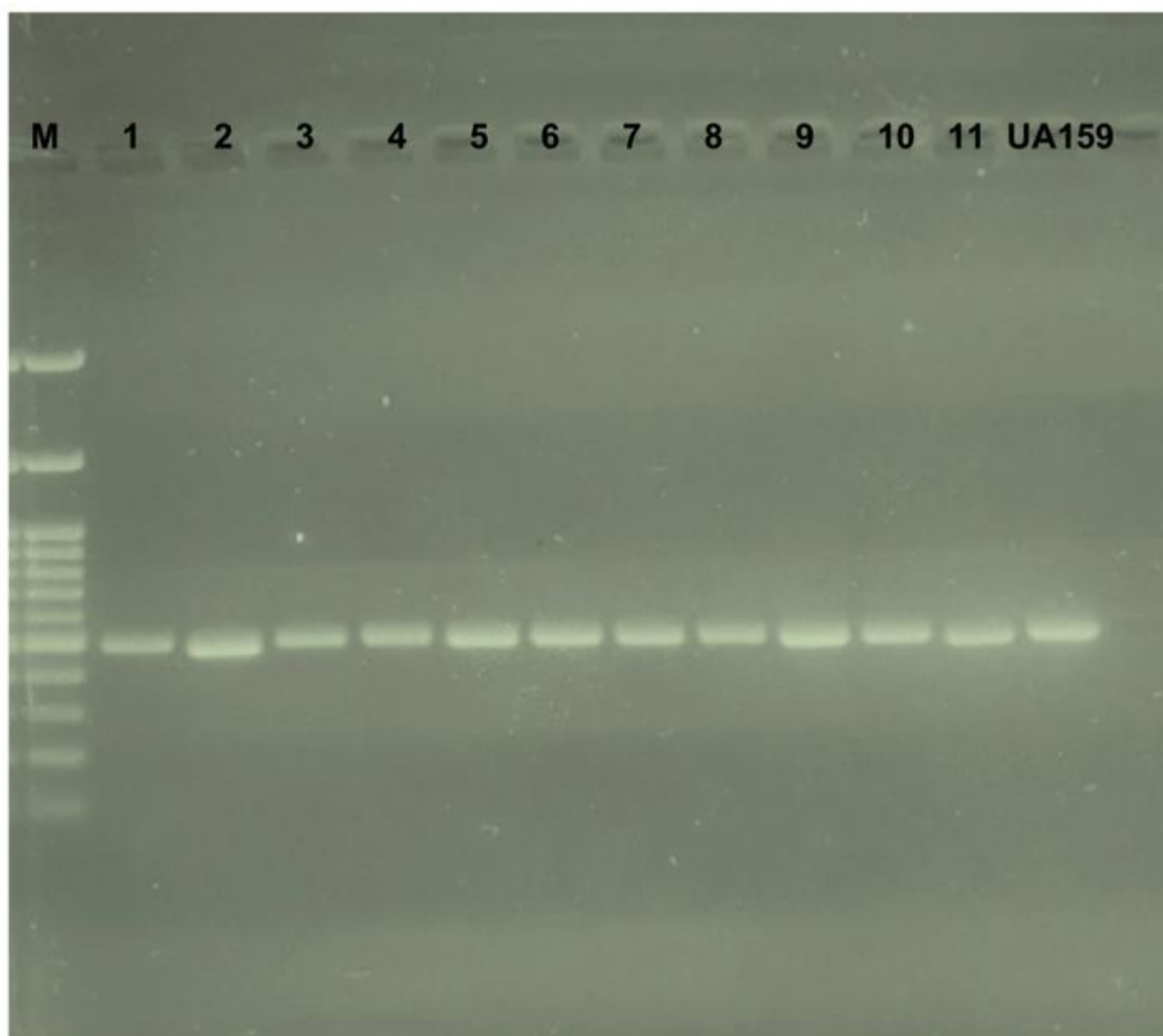
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na reação de PCR todos os isolados clínicos do presente trabalho apresentaram o fragmento esperado de 517 pb específico para *S. mutans*, como pode ser visualizado na **Figura 11**.

As sequências nucleotídicas dos isolados clínicos, obtida através do

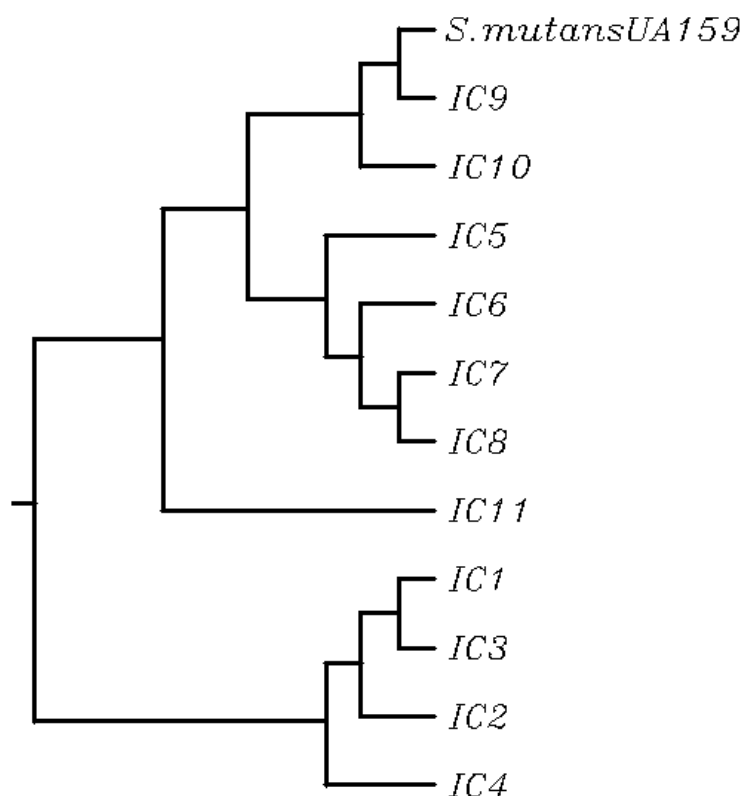
sequenciamento automático do gene GTFB, demonstraram similaridade em torno de 87% com a sequência da cepa padrão de *S. mutans* UA 159 depositada no Gene Bank (nº de acesso: NC_004350.2), conforme **Figura 12**.

Figura 11- Gel de Agarose 1,5% em TBE, corado por brometo de etídio e visualizado no transluminador



Legenda: Isolados clínicos de 1 a 11 identificados como *S. mutans* por apresentaram o fragmento esperado de 517pb. Can 1- marcador de peso molecular (Ladder 100pb); Can. 2 a 12- isolados clínicos; Can. 13- cepa padrão de *S. mutans* UA 159; Can 14- controle negativo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12- Árvore filogenética



Legenda: Árvore filogenética construída baseada na similaridade das sequências de DNA dos 11 isolados clínicos e a cepa padrão UA159 utilizando o software MaFFT(v.7). A similaridade foi em torno de 87%.

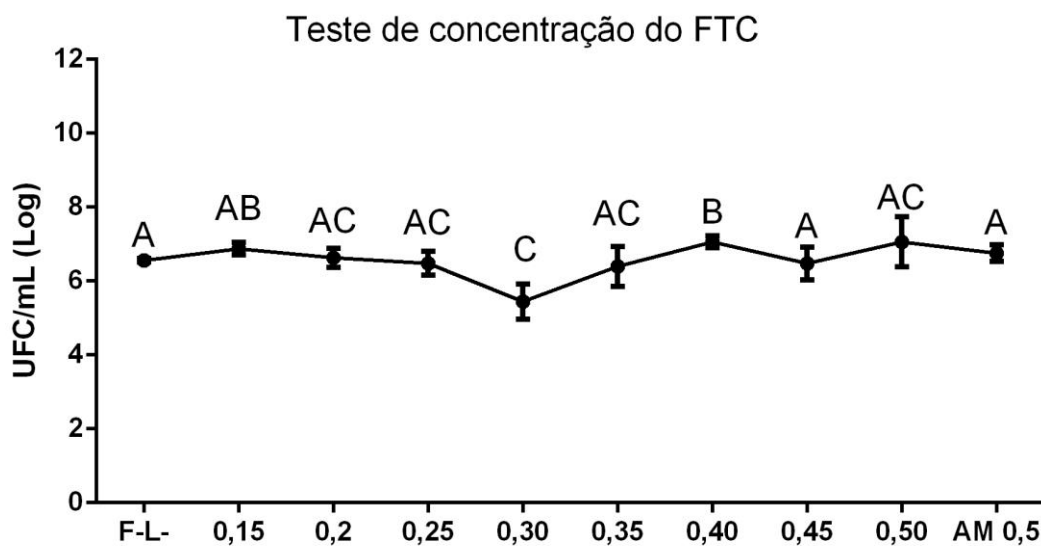
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *S. mutans*

Como não existem estudos prévios na literatura que testaram o fotossensibilizador FTC nem o PDZ sobre *S. mutans*, previamente realizamos um estudo para avaliar a toxicidade desses fotossensibilizadores no escuro. Para isso testamos a associação a cepa padrão de *S. mutans* com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores: 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45 e 0,5 mg/mL,.

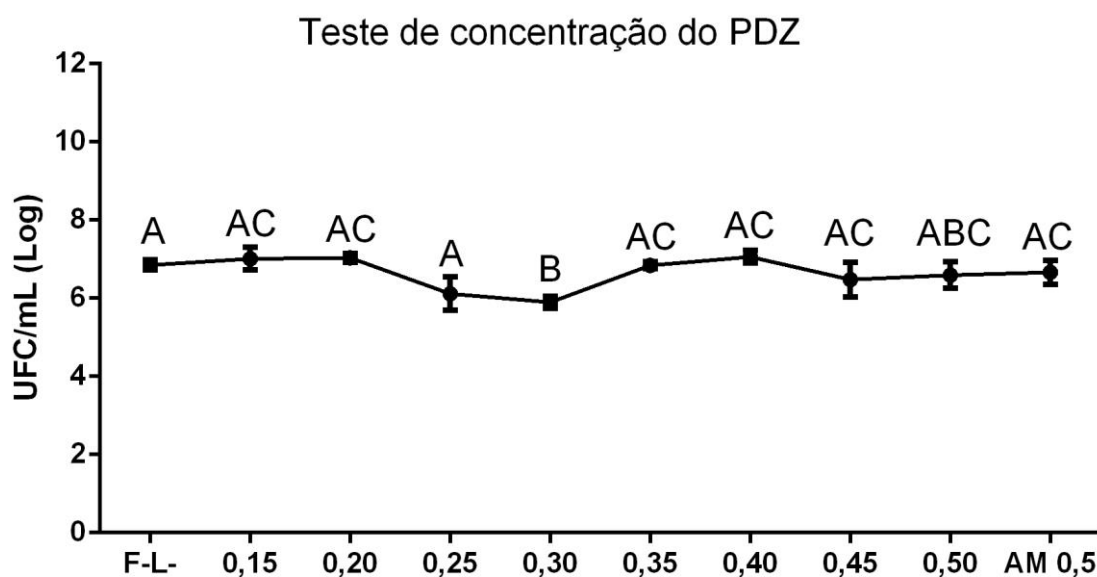
Os resultados demonstram que a maioria das concentrações utilizadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle., Apenas as concentrações 0,3 e 0,4 mg/mL do FTC e a 0,3 mg/mL do PDZ apresentaram diferença significativa (**Figura 13 e 14**).

Figura 13- Dados de UFC/mL (Log) obtidos no teste para avaliação da toxicidade no escuro do FTC em diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo autor.

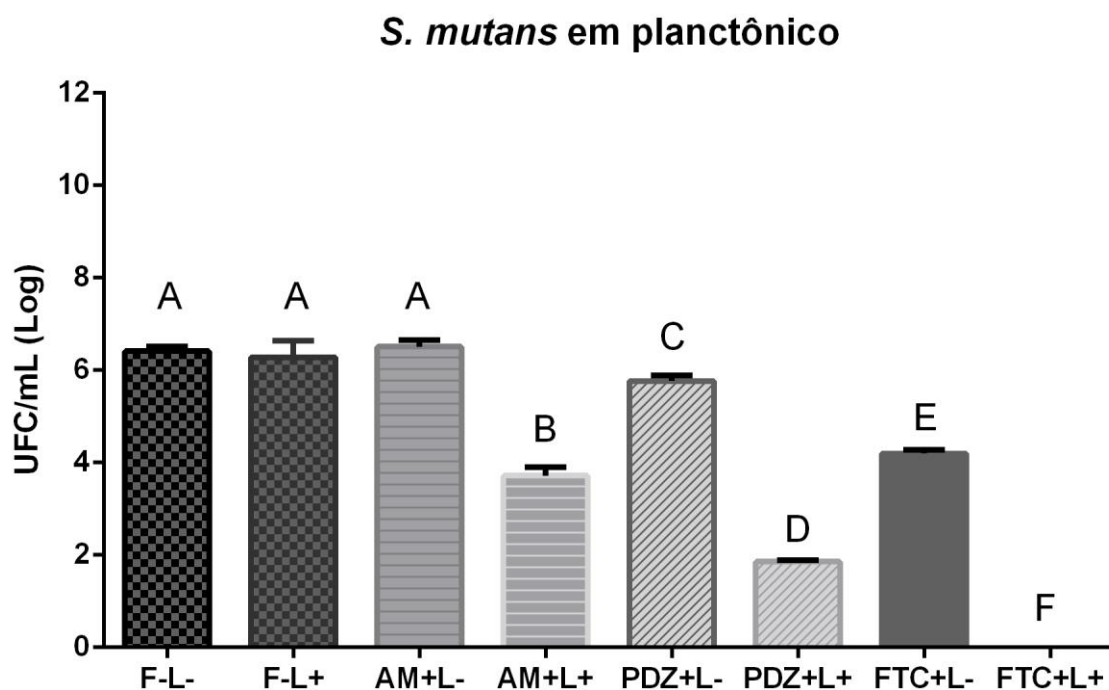
Figura 14- Dados de UFC/mL (Log) obtidos no teste para avaliação da toxicidade no escuro do PDZ em diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante desses resultados, a concentração de 0,3 mg/mL para o PDZ eo FTC foram selecionadas para os estudos da TFD nas culturas planctônicas de *S. mutans*. Nos ensaios de TFD sobre cepa ATCC de *S. mutans* (**Figura 15**), todos os fotossensibilizadores tiveram efeito inibitório após a irradiação, com uma diminuição de 2 e 4 log para os grupos AM+L+ e PDZ+L+, respectivamente. Além disso, foi encontrada uma redução total na contagem de UFC/mL no grupo FTC+L+. Em relação a análise dos grupos com o fotossensibilizador no escuro, tivemos uma pequena redução no grupo PDZ+L- e uma redução de 1,5 log no grupo FTC+L- quando comparados ao grupo controle. Quando analisado a diferença entre os grupos irradiados e não irradiados (AM+L- x AM+L+; FTC+L- x FTC+L+ e PDZ+L- x PDZ+L+) valor de *p* foi inferior a 0.0001 para todos as comparações.

Figura 15- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas com cepa de *S. mutans* ATCC



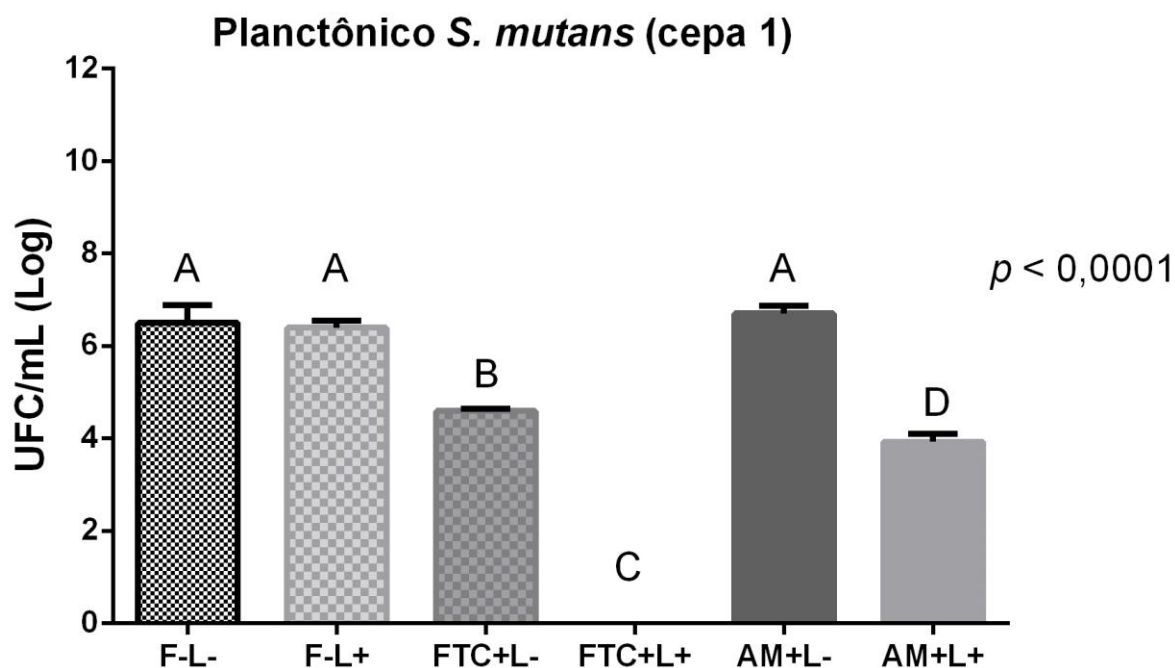
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); grupo PDZ (PDZ+L-); grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como no teste anterior, o melhor fotossensibilizador entre as Clorinas foi o FTC, prosseguimos para os testes da TFD sobre as cepas clínicas de *S. mutans*, somente com os fotossensibilizadores FTC e o AM.

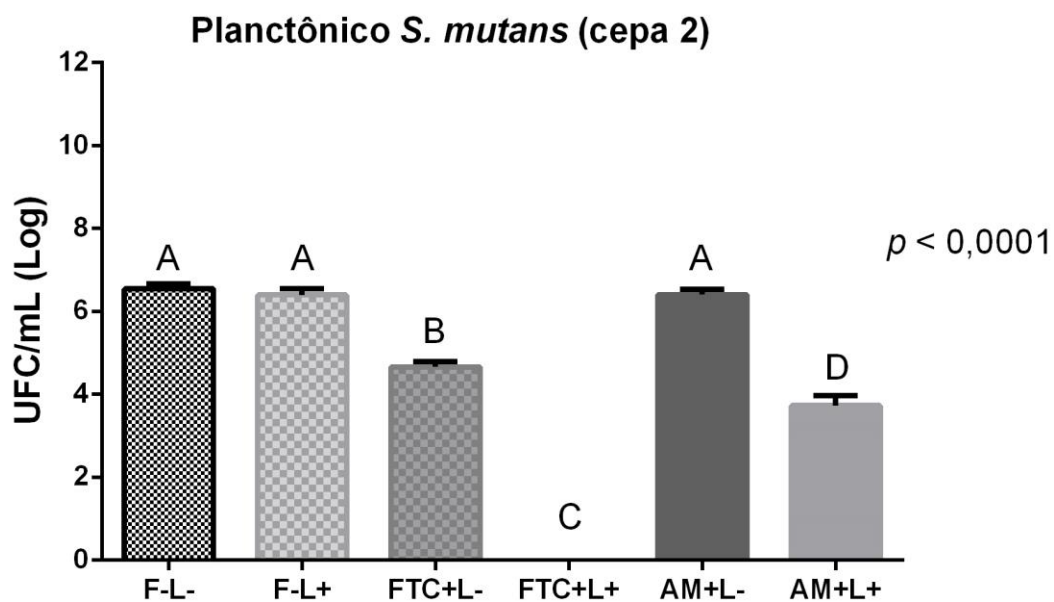
Os resultados da TFD sobre as culturas planctônicas das cepas clínicas de *S. mutans* estão apresentadas nas **Figuras 16 a 26**, nas quais pode-se observar que os grupos F-L+ e AM+L- não apresentaram diferença quando comparados ao grupo controle para nenhuma das cepas estudadas. O grupo FTC+L- apresentou uma variação na ação da citotoxicidade no escuro entre as cepas. O grupo AM+L+ também apresentou redução significativa em todas as cepas quando comparado ao grupo controle, e ao serem comparadas ao grupo FTC+L- as cepas 8 e 10 desse grupo não apresentaram diferenças estatística significativa, ou seja o FTC no escuro foi tão toxico para essas cepas quanto a TFD associada com o AM. O grupo da TFD com o FTC (FTC+L+) apresentou uma inibição total no crescimento de todas as cepas assim como na ATCC.

Figura 16- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 1 de *S. mutans*



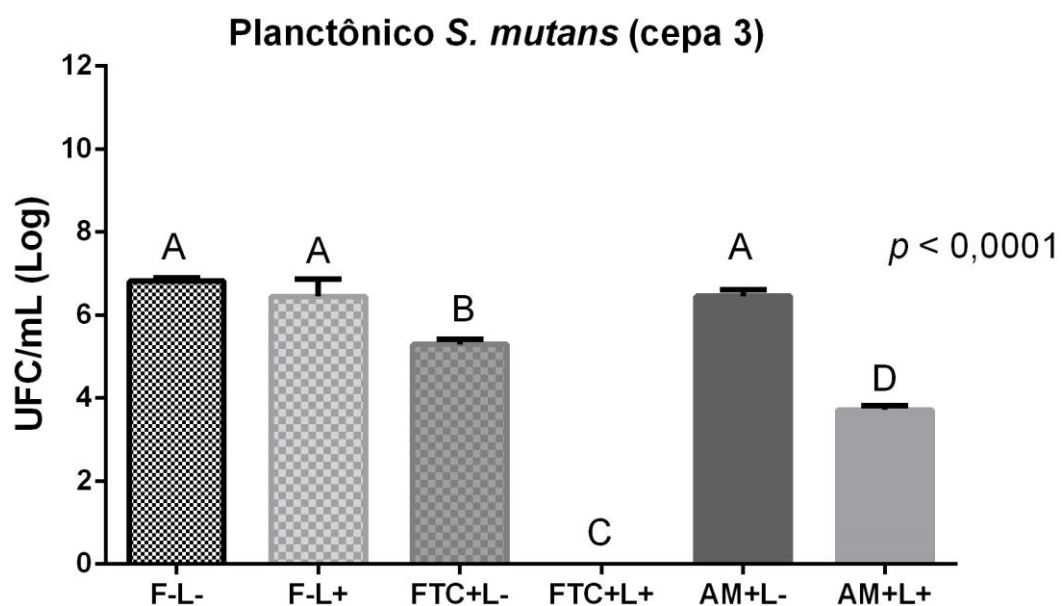
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 2 de *S. mutans*



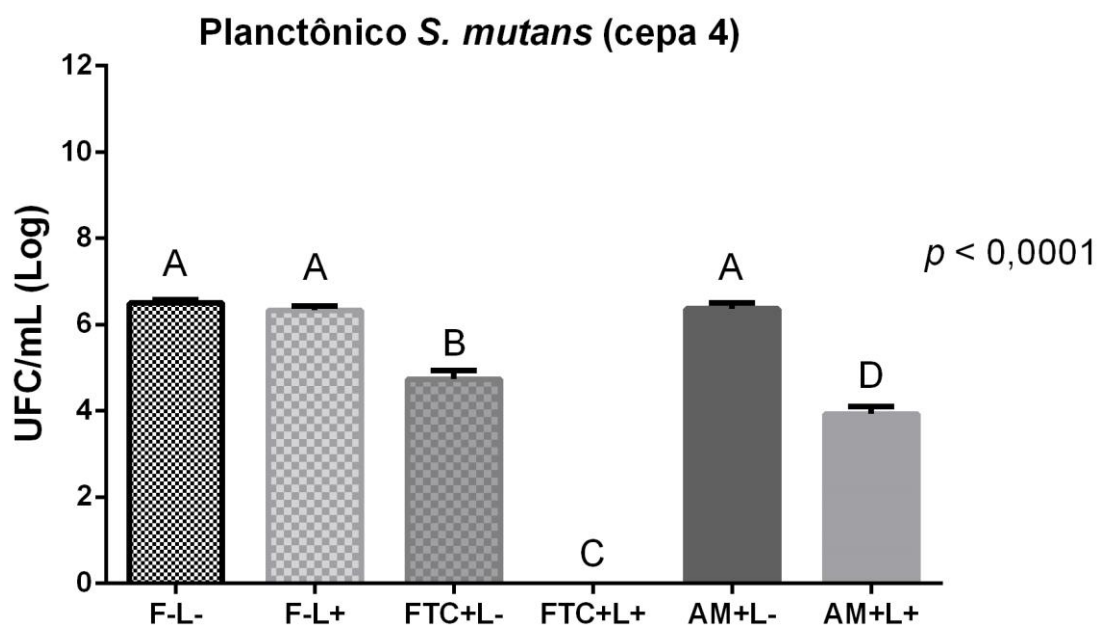
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 3 de *S. mutans*



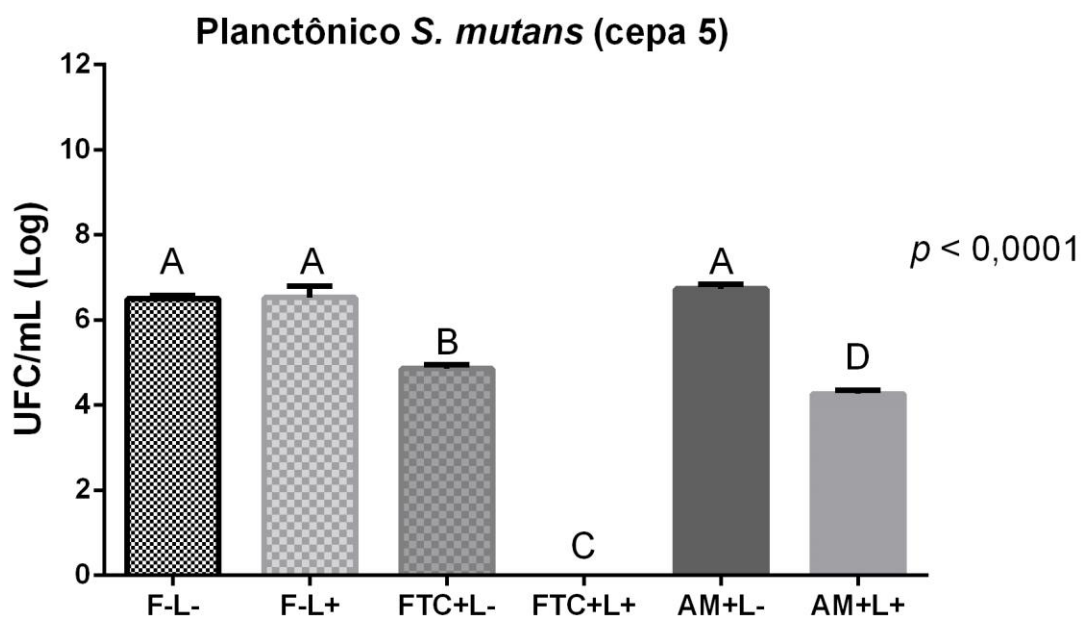
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 4 de *S. mutans*



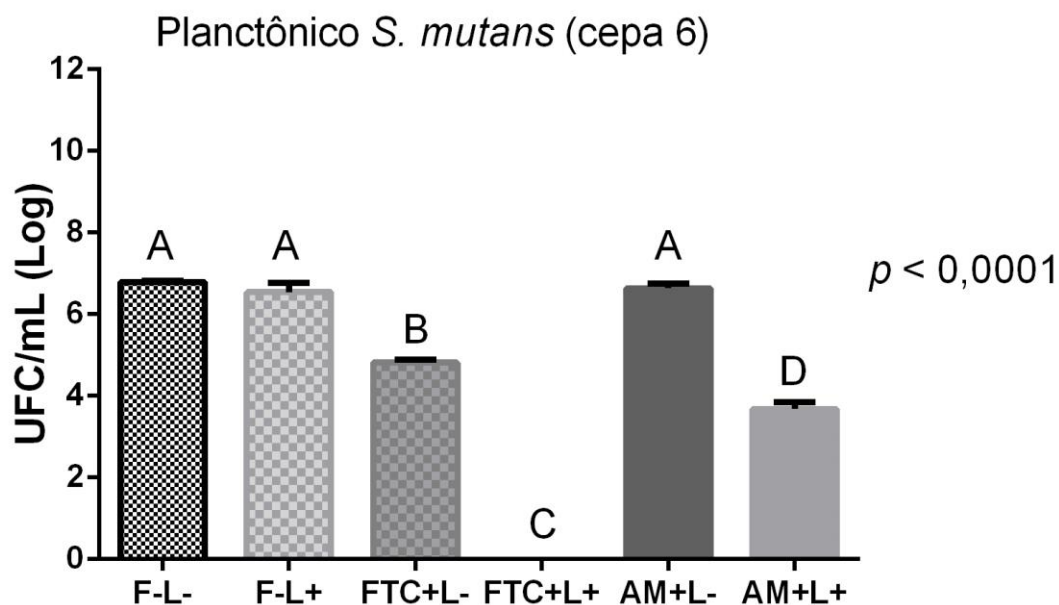
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 5 de *S. mutans*



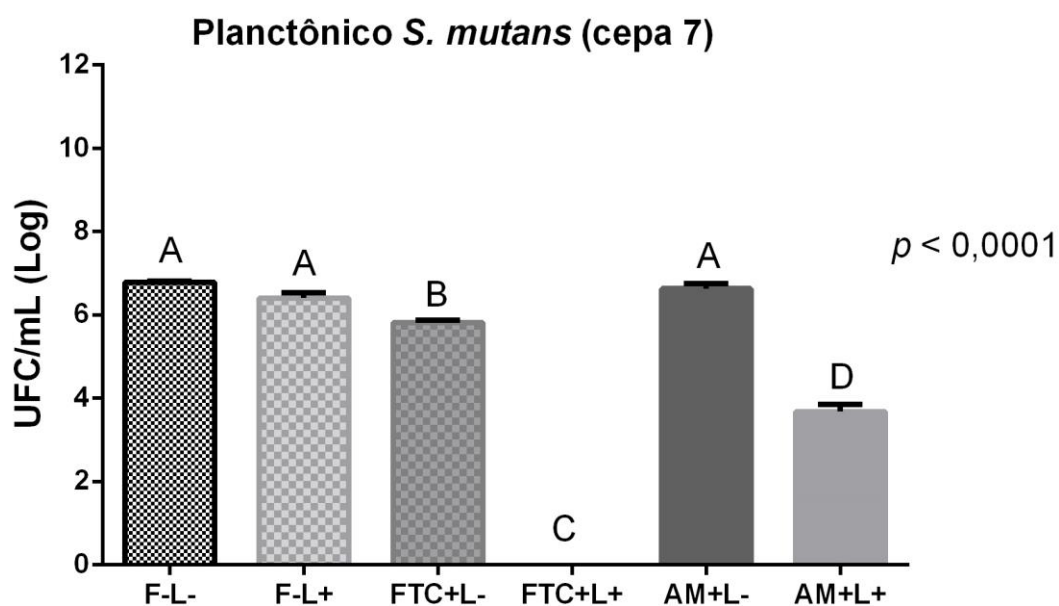
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 6 de *S. mutans*



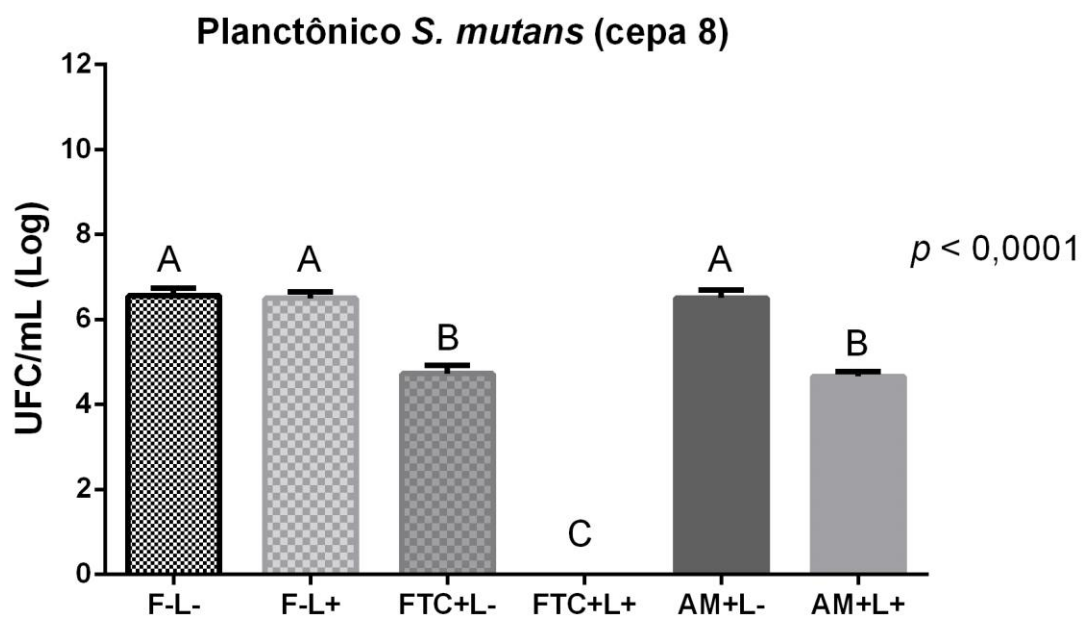
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 7 de *S. mutans*



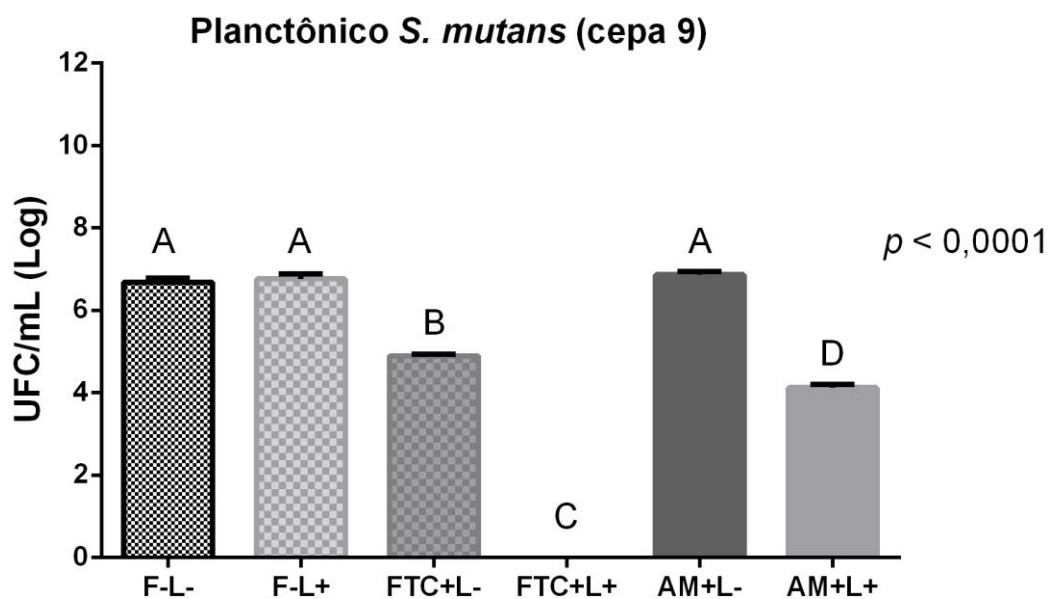
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 8 de *S. mutans*



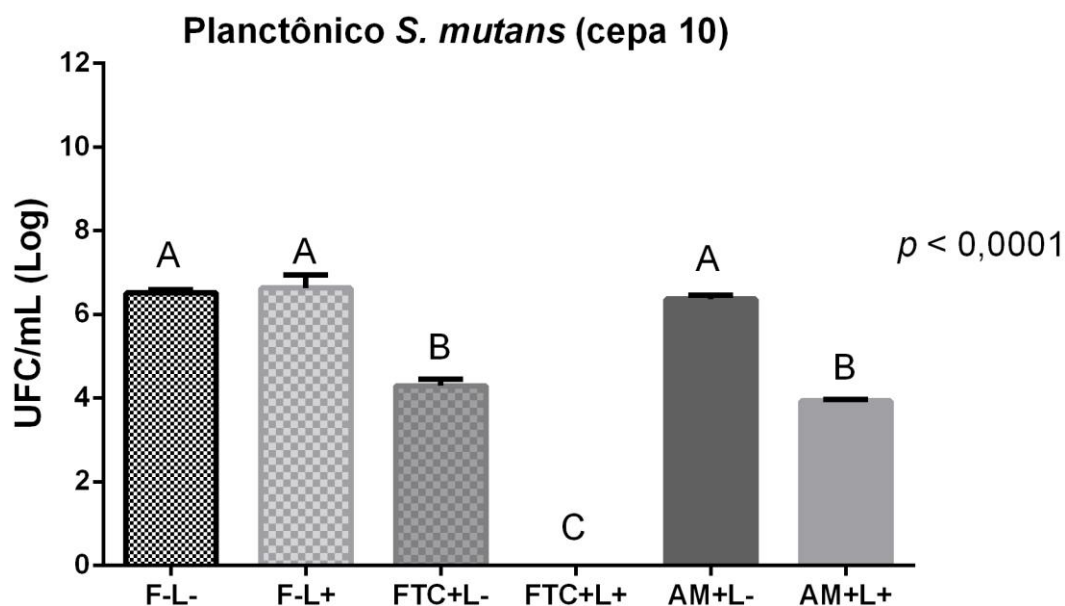
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 9 de *S. mutans*



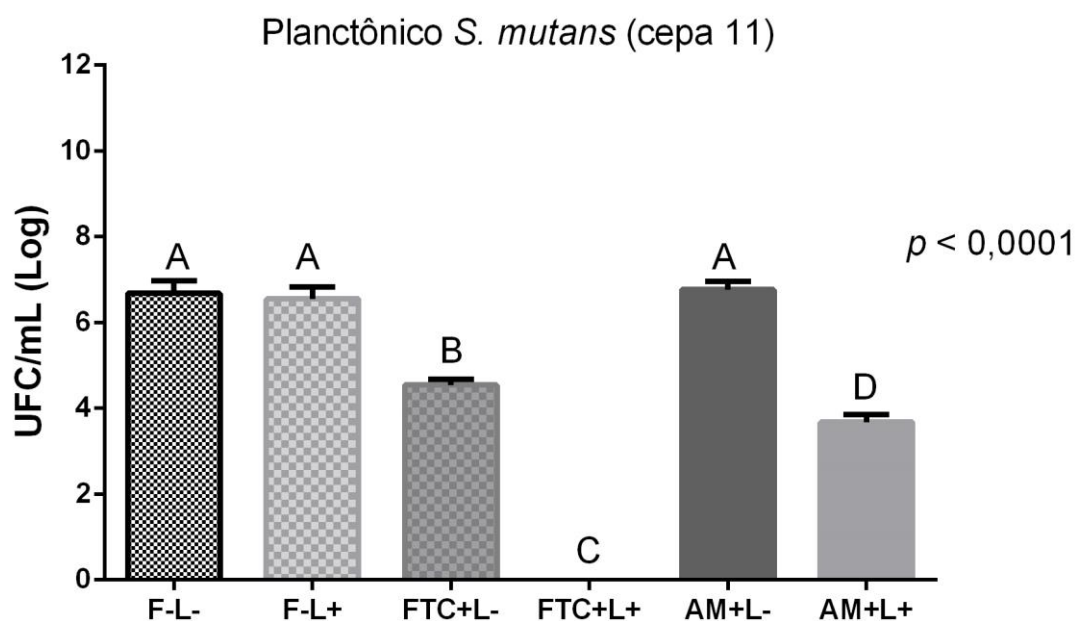
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 10 de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26- Dados de UFC/mL obtidos no teste em culturas planctônicas cepa clínica 11 de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); grupo com Azul de Metileno e irradiação (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante dos resultados da redução de UFC/mL em culturas planctônicas e dos dados da coleta das cepas clínicas (classificação das cavidades de cárie), foram selecionadas 4 cepas para o estudo da TFD em biofilmes: cepa 2 (isolada de lesão de cárie de Classe I), cepa 3 (isolada de lesão de Classe III), cepa 6 (isolada de lesão de cárie de classe II) e cepa 11 (isolada de lesão de Classe V).

4.3 Ação da terapia fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* por meio da contagem de células viáveis (UFC/mL)

Ao iniciar os testes para avaliação da ação da TFD em biofilme de *S. mutans* sobre corpos-de-prova de dente bovino, inicialmente, foi realizado um teste com cepa ATCC e os três fotossensibilizadores.

Os resultados 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 no grupo sem tratamento (F-L-). O tratamento com Laser na ausência do fotossensibilizador (F-L+) não reduziu o número de células de *S. mutans*, indicando que o uso isolado do Laser não teve ação antimicrobiana (**Figura 27**).

Quando os biofilmes foram tratados apenas com os fotossensibilizadores na ausência de luz, verificou-se que para AM (AM+L-) não houve redução do número de *S. mutans* em relação ao grupo controle (F-L-). Entretanto, o uso isolado dos fotossensibilizadores derivados da Clorina (PDZ+L- e FTC+L-) reduziu o número de células do biofilme em relação ao controle (F-L-), indicando que tanto o PDZ como o FTC apresentam efeitos citotóxicos sobre *S. mutans* (**Figura 27**).

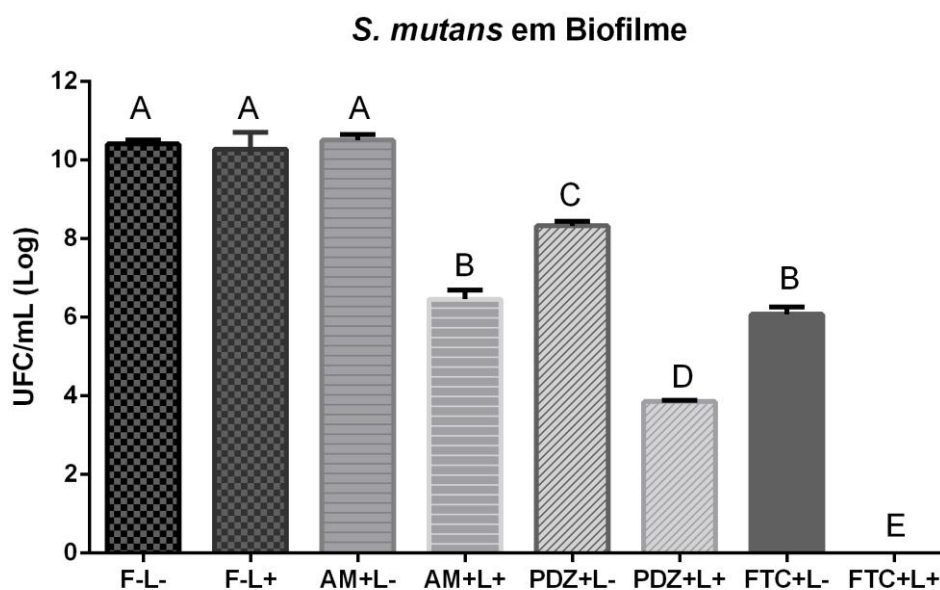
Em relação aos grupos tratados com terapia fotodinâmica, os 3 fotossensibilizadores utilizados levaram a uma redução significativa no número de *S. mutans*, com diferença estatística significativa entre os grupos AM+L- x AM+L+, PDZ+L- x PDZ+L+ e FTC+L- x PDZ+L+, onde o valor de *p* foi sempre inferior a 0.0001 nessas comparações. Quando comparados ao grupo controle (F-L-), o grupo AM+L+ teve uma redução de aproximadamente 4log, o grupo PDZ+L+ apresentou uma redução de 6 log, enquanto o grupo FTC+L+ eliminou completamente o biofilme

de *S. mutans* (**Figura 27**).

Para o estudo da TFD nas 4 cepas clínicas de *S. mutans*, foram utilizados apenas os fotossensibilizadores AM e FTC. Os resultados demonstraram que todas as cepas foram capazes de formar biofilme em torno de 10 log de UFC/mL entretanto a susceptibilidade à TFD variou bastante entre as cepas estudadas (**Figura 28 a 31**).

Os grupos F-L+ e AM+L- da cepa 2 não apresentaram diferença quando comparados ao controle e nem entre si, e assim como na ATCC os grupos AM+L+ e FTC+L- não apresentaram diferença estatística entre eles, ambos fizeram uma inibição de aproximadamente 2 log. Já o grupo FTC+L+ apresentou uma redução de aproximadamente 5 log. As cepas 3 e 11 não apresentaram diferença estatística somente no grupo F-L+ quando comparado ao grupo controle. O grupo AM+L- apresentou uma redução de 1 log em ambas as cepas. O grupo AM+L+ apresentou uma inibição de 3 log para a cepa 3 e aproximadamente 4 log para cepa 11. Em relação ao grupo FTC+L+, as reduções foram de 6 e 7 log e no grupo FTC+L- as reduções foram de 2 e 3 log respectivamente. A cepa 6 foi a cepa que demonstrou o maior efeito do FTC, tanto no escuro com uma inibição de 5 log, quanto na ação da TFD com uma redução de 8 log, e o menor efeito do grupo AM+L+ com uma inibição de aproximadamente 1,5 log. Os demais grupos dessa cepa não apresentaram diferença em relação ao controle.

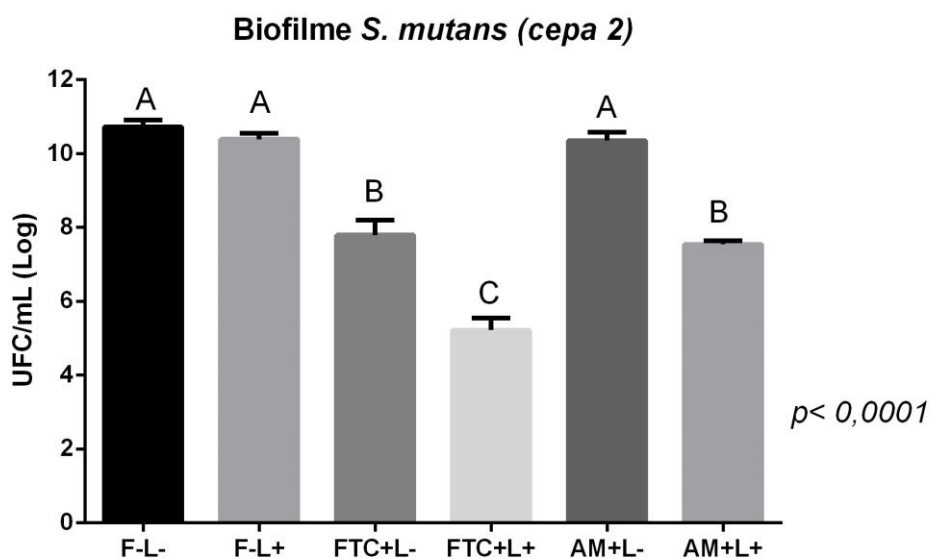
Figura 27- Dados de UFC/mL obtidos nos testes em biofilme com cepa ATCC de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); grupo PDZ (PDZ+L-); grupo TFD com PDZ (PDZ+L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

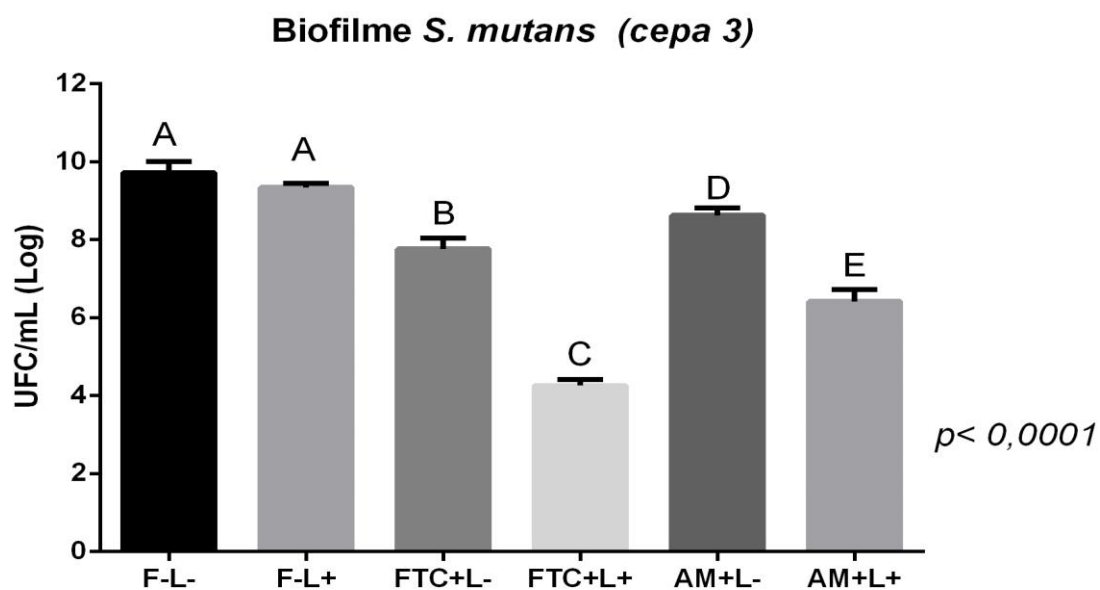
Figura 28: Dados de UFC/mL obtidos nos testes em biofilme com cepa clínica 2 de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+).

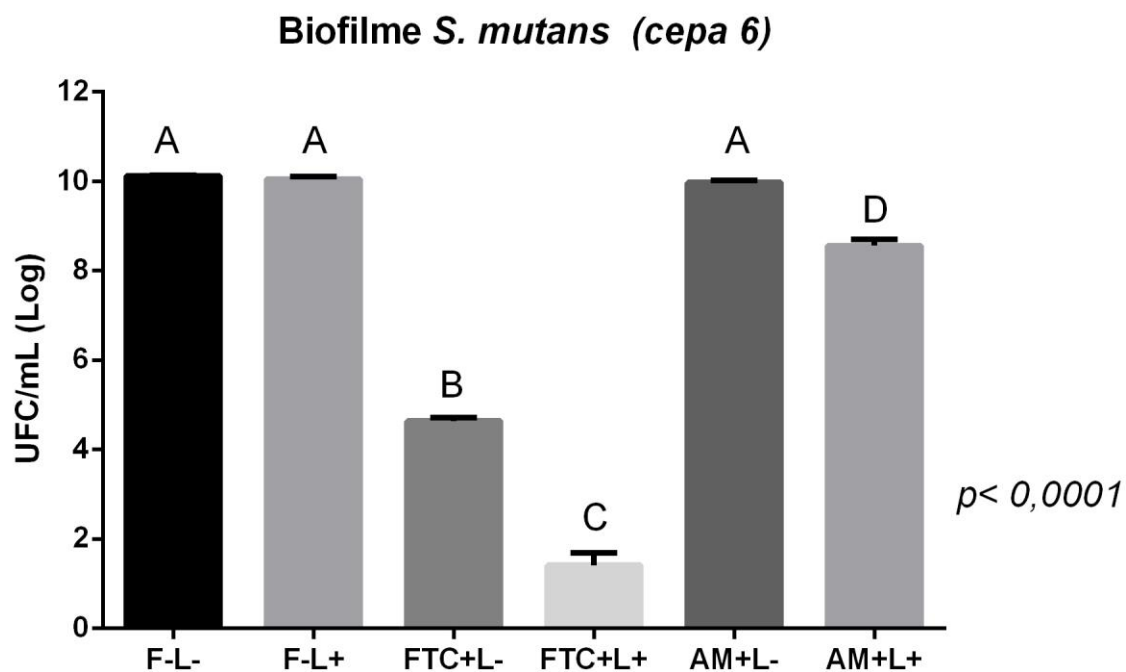
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29- Dados de UFC/mL obtidos nos testes em biofilme com cepa clínica 3 de *S. mutans*



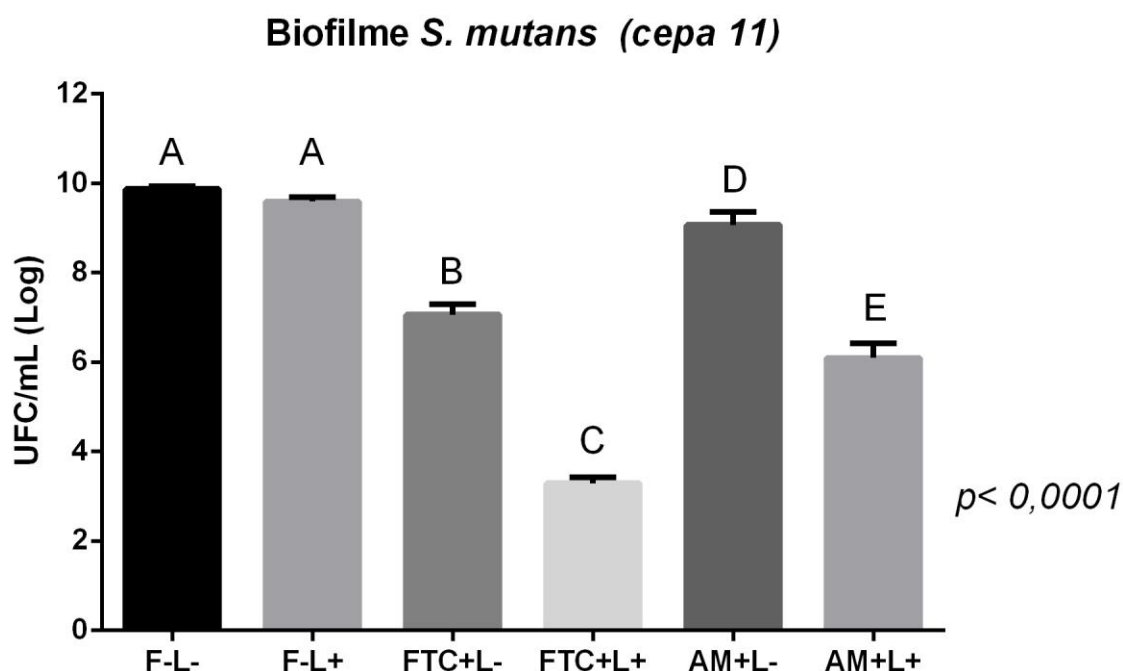
Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30- Dados de UFC/mL obtidos nos testes em biofilme com cepa clínica 6 de *S. mutans*



Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31- Dados de UFC/mL obtidos nos testes em biofilme com cepa clínica 11 de *S. mutans*

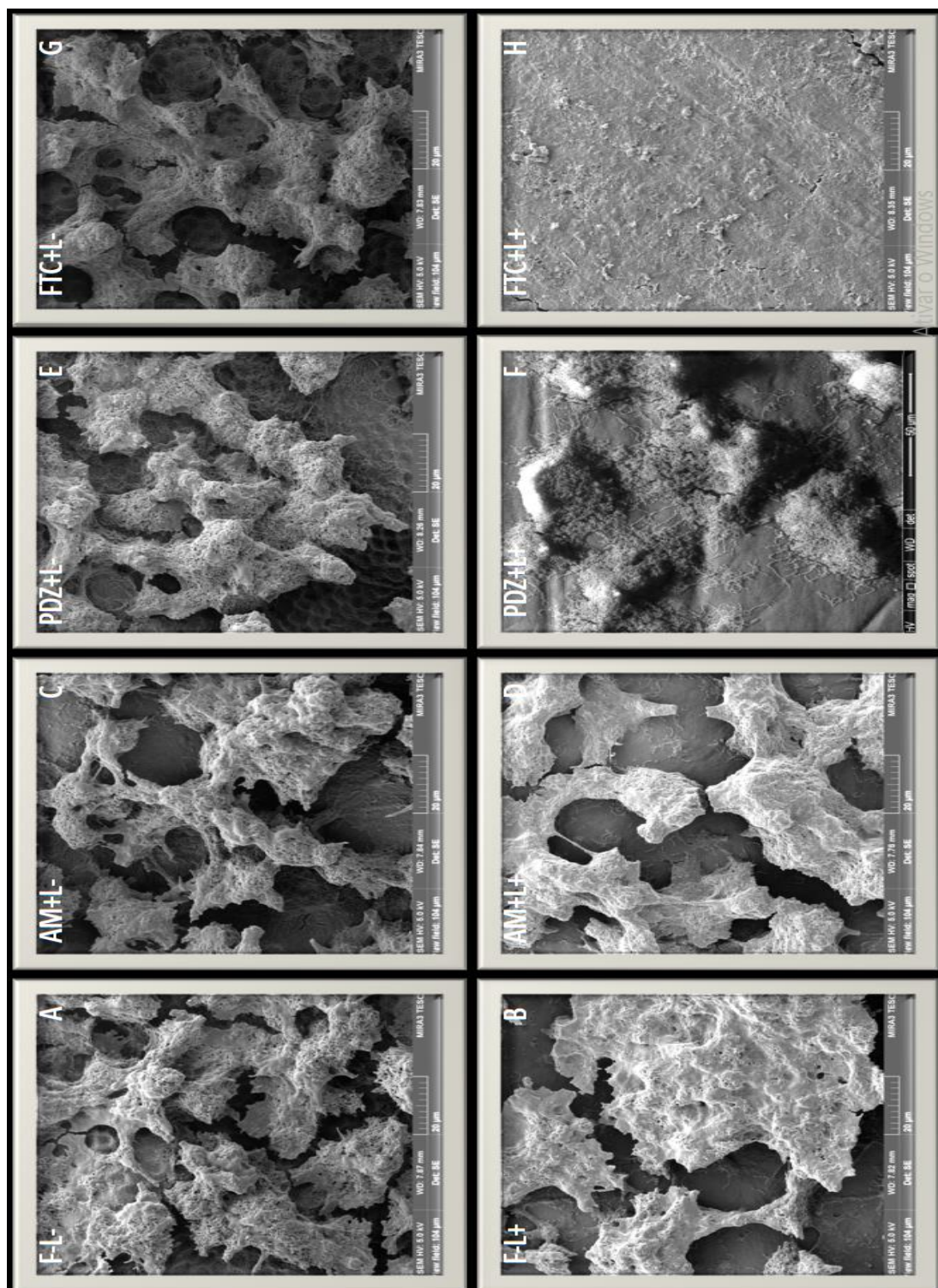


Legenda: Grupo controle (F-L-); grupo só luz (F-L+); grupo FTC (FTC+L-); grupo TFD com FTC (FTC+L+); grupo Azul de Metileno (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

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

Na Microscopia Eletrônica de Varredura, os grupos F-L-, F-L+ e AM+L- apresentaram biofilmes formados por uma densa massa constituída de cocos e matriz extracelular. Por outro lado, os grupos tratados com terapia fotodinâmica (AM+L+, PDZ+L+ e FTC+L+) demonstraram redução na massa de biofilme com várias lacunas entre os aglomerados de células. Essa redução do biofilme provocada pela PDT foi muito mais evidente nos grupos tratados com os fotossensibilizadores derivados da Clorina, principalmente o grupo com FTC. Assim, pode-se observar que as imagens obtidas na MEV coincidiram com os resultados obtidos na contagem de células viáveis, confirmando que os fotossensibilizadores derivados da clorina foram capazes de desestruturar os biofilmes e eliminar o número de células de *S. mutans* (**Figura 32**).

Figura 32- MEV da superfície de esmalte com biofilme de *S. mutans* (ATCC).



Legenda: Todas as imagens possuem aumento de 5.0 kx. A) grupo controle F-L-; B) grupo irradiação F-L+; C) grupo Azul de Metileno AM+L-; D) grupo TFD com Azul de Metileno AM+L+; E) grupo Photoditazine PDZ+L-; F) grupo TFD com Photoditazine PDZ+L+; G) grupo Fotoentcine FTC+L- e H) grupo TFD com Fotoentcine FTC+L+.

Fonte: Elaborado pelo autor.

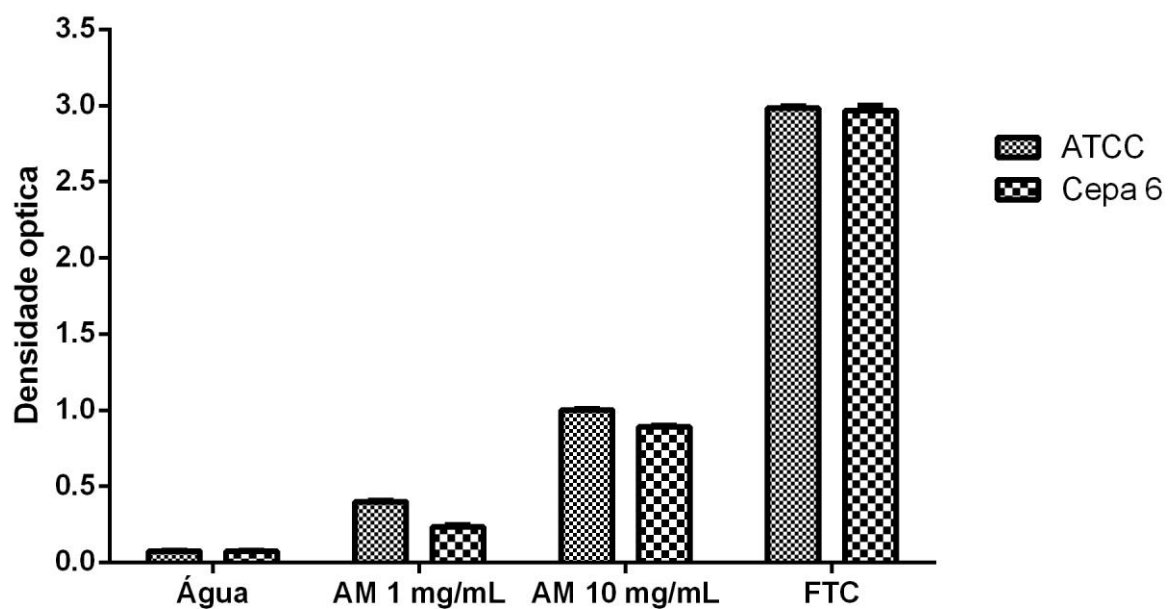
4.5 Análise da absorbância dos fotossensibilizadores pelas células de *S. mutans*

Os resultados dos testes de absorbância dos fotossensibilizadores, demonstraram que tanto as células de *S. mutans* da cepa ATCC, como da cepa clínica, foram capazes de absorver os fotossensibilizadores estudados (AM e FTC) **(Figura 33)**.

O fotossensibilizador AM foi testado em duas concentrações diferentes (1 e 10 mg/mL). Em ambas as cepas as densidades ópticas (DO) obtidas foram superiores ao grupo controle sem fotossensibilizador (tratado apenas com água). As DO obtidas foram de aproximadamente 0,5 e 1,0 respectivamente, para AM 1 mg/mL e AM 10 mg/mL, demonstrando que o aumento da concentração do AM levou à uma maior absorção do fotossensibilizador pelas células de *S. mutans* **(Figura 33)**.

Interessantemente, o fotossensibilizador FTC demonstrou uma DO igual a 3,0, indicando que a capacidade do FTC em penetrar nas células de *S. mutans* foi 3 vezes maior que o Azul de Metileno **(Figura 33)**. Esses dados podem explicar a maior eficácia antimicrobiana obtida pela TFD com FTC em relação ao AM, tanto nos estudos planctônicos como em biofilmes de *S. mutans*.

Figura 33- Valores da Densidade Óptica nos testes de absorbância dos fotossensibilizadores pelas células de *S. mutans* (cepa ATCC e Cepa 6)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos vários métodos para prevenção e tratamento da cárie dentária têm sido investigados. Estudos avaliando o efeito da aplicação da TFD na odontologia vem crescendo rapidamente, com base nos benefícios dessa terapia já comprovadas em estudos anteriores. Acredita-se que a TFD possa vir a ser proposta como primeira escolha de tratamento e prevenção da cárie dentária, entretanto, para isso, ainda se faz necessário a realização de estudos com novos fotossensibilizadores disponíveis no mercado sobre bactérias cariogênicas. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar e comparar os efeitos da terapia fotodinâmica mediada por duas classes da Clorina, Photoditazine® e Fotoenticine®, sobre diferentes cepas de *S. mutans*.

Os resultados da ação da TFD sobre culturas planctônicas alcançados nesse trabalho foram muito satisfatórios. Com a cepa ATCC de *S. mutans*, o grupo controle teve um crescimento de 6 log de UFC/mL. Após a aplicação da TFD houve uma redução de aproximadamente 2 log para o grupo AM+L+, de 4 log para o grupo PDZ+L+ e redução total para o grupo FTC+L+.

Na literatura não existem trabalhos que tenham avaliado o efeito das Clorinas PDZ e FTC sobre culturas planctônicas de *S. mutans*, entretanto, é possível encontrar trabalhos que utilizaram Rhadachlorin®, uma classe de Clorina proveniente da Rússia, para avaliação da inibição desse micro-organismo em culturas planctônicas. Hakimiha et al. (2014) analisaram o efeito da TFD com o Azul de toluidina e Rhadachlorin® sobre culturas planctônicas da cepa ATCC 25175 de *S. mutans* e observaram uma redução de aproximadamente 1,5 log em ambos os fotossensibilizadores, por outro lado, Vahabi et al. (2011) ao estudarem os efeitos de Rhadachlorin® sobre *S. mutans* não encontraram diferenças estatísticas entre os grupos TFD e o controle. Os resultados de ambos os trabalhos citados com Rhadachlorin® ficaram muito aquém dos alcançados com os fotossensibilizadores derivados da Clorina do presente trabalho, mas se aproximam do que encontramos com o AM.

Paschoal et al. (2013) também estudaram a ação da TFD em culturas planctônicas em cepa ATCC 25175 de *S. mutans*, só que com a associação de

curcumina 400 μm com a densidade de energia de 48 J/cm^2 , e obtiveram uma redução de aproximadamente 4 log no grupo com TFD. Embora, esse estudo tenha utilizado uma densidade de energia maior que a do presente trabalho, o resultado ficou muito similar ao do grupo PDZ+L+ do nosso trabalho. Isso mostra que apesar dos fotossensibilizadores serem de origens diferentes, eles podem ter ações semelhantes em determinados micro-organismos. Leite et al. (2016) também alcançaram uma inibição completa da cepa ATCC de *S. mutans* em crescimento planctônico, quando aplicada a luz em alta intensidade 96 J/cm^2 associada com o fotossensibilizador Rosa Bengala.

A literatura está amplamente embasada com a ação da TFD com diversos fotossensibilizadores sobre cepas ATCC de *S. mutans*, mas são poucos que apresentam uma inibição completa do micro-organismo. Existe uma grande importância para a realização de trabalhos com cepas ATCC, pois esses estudos podem ser reproduzidos e usados como parâmetro em qualquer lugar do mundo. Entretanto, estudos com cepas clínicas são de extrema importância, já que essas cepas podem apresentar mais resistência aos tratamentos devido às suas mutações para sobrevivência no meio.

Costa et al. (2010) estudaram a ação da TFD sobre cepa clínica de *S. mutans* com os fotossensibilizadores Rosa Bengala e Eritrosina, verificando-se que os grupos só luz ou só fotossensibilizador não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle, mas os grupos da TFD com Rosa Bengala e Eritrosina apresentaram redução de 6,5 e 5 log respectivamente. Apesar de uma redução muito significativa do grupo Rosa Bengala quando comparado com o estudo de Leite et al. (2016) já citado percebemos a diferença de inibição de uma cepa ATCC para uma cepa clínica.

Tonon et al. (2015) demonstraram que a cepa ATCC de *S. mutans* foi muito mais susceptível a TFD com curcumina do que as cepas clínicas desse micro-organismo tratadas na mesma condição. No presente estudo os resultados dos testes com as 11 cepas clínicas coletadas, foram muito semelhantes ao que foi apresentado no teste com a cepa ATCC, onde o grupo FTC+L+ apresentou uma inibição completa na contagem de UFC/mL, e houve também uma inibição significativa que variou de 1,5 a 2 log para os grupos AM+L+ em todas as 11 cepas clínicas.

Os resultados da ação da TFD encontrados no presente estudo com cepas clínicas se apresentaram mais significativos do que os testes feitos com diferentes fotossensibilizadores em cepas ATCC de *S. mutans*, em culturas planctônicas presentes na literatura. Diante desse fato e tendo em vista que a patogenicidade e resistência à tratamentos de *S. mutans* está intimamente associada à sua capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas da cavidade bucal, torna-se importante a realização de estudos com TFD para inibição do biofilme de *S. mutans* em materiais ou tecidos semelhantes aos encontrados no meio bucal.

Devido ao avanço dos programas de odontologia preventiva, nos últimos anos a extração dentária vem reduzindo drasticamente e com isso a dificuldade para se conseguir dentes extraídos de humanos vem aumentando (Campos et al., 2008; Guerra, 2008), o que dificulta estudos com dentes humanos. Entretanto estudos, como o de Nogueira et al. (2014), mostram que dentes bovinos são excelentes substitutos dos dentes humanos. O Brasil possui o maior rebanho de bovinos das Américas, por grande parte desse rebanho ser direcionado para a produção de carne, ocorre uma alta disponibilidade de dentes bovinos que podem ser utilizados para a pesquisa (Santana et al., 2011). Falla-Sotelo et al. (2005) avaliaram os principais elementos do esmalte de dentes humanos, bovinos e suínos, observando que a quantidade de cristais de hidroxiapatita nos três é muito semelhante, sem diferença estatística. Campos et al. (2008) concluíram que incisivos mandibulares permanentes de bovinos são excelentes substitutos para os dentes humanos na pesquisa. Diante desse embasamento literário, no presente trabalho foi realizado a formação do biofilme de *S. mutans* em corpos-de-prova confeccionados a partir de incisivos mandibulares permanentes de dentes bovinos.

Existem diversos estudos mostrando o efeito da TDF em biofilme de cepa ATCC de *S. mutans*, porém são poucos os que utilizaram superfície de tecidos dentários para a formação do mesmo. Quishida et al. (2015a) avaliaram a ação da TDF com diferentes concentrações de PDZ (100, 150, 175 e 200 mg/mL) em biofilmes multiespécie (*C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*) em fundo de placas, observando uma redução significativa de 2 e 3 log aproximadamente na viabilidade das colônias nas três espécies quando associados com a concentração de 175 e 200 mg/mL de PDZ respectivamente. Porém quando esse mesmo grupo de pesquisa passou essa formação de biofilme multiespécie para corpos-de-prova com

resina acrílica não foi constatado diferença estatística significativa em nenhum grupo de tratamento quando comparado ao grupo controle (Quishida et al., 2015b). Esses estudos demonstraram que a superfície onde o biofilme é formado influencia na sua susceptibilidade ao tratamento. O fotossensibilizador PDZ utilizado nesses estudos também foi utilizado no nosso trabalho, apresentando maior efeito do que nos trabalhos de Quishida et al. (2015a e 2015b). Essa diferença de resultado pode ser devida as diferenças de protocolos dos estudos como por exemplo a diferença de concentração utilizada em cada estudo, o biofilme ser multiespécie e não apenas de *S. mutans* ou até mesmo a diferença de corpo-de-prova.

Nemezio et al. (2017) avaliaram a viabilidade de *S. mutans* UA 159 em um modelo de biofilme sobre corpos-de-prova de acrílico após o tratamento com TFD com o AM, como controle foi utilizado tratamento com Clorexidina. A TFD reduziu, 1,5 log, porém não tanto quanto o tratamento com a clorexidina que levou a eliminação total do micro-organismo. No nosso trabalho, o grupo da TFD com AM apresentou uma inibição bem mais significativa do que a encontrada por Nemezio et al. (2017). A redução foi aproximadamente 4 log e assim como a clorexidina, o grupo TFD com FTC do presente trabalho, também, apresentou inibição completa na contagem de células viáveis. Sabemos que a Clorexidina tem um amplo poder de ação tanto em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quanto em fungos, porém apresentam diversos efeitos colaterais. Diante dos nossos resultados percebemos que o FTC pode ser uma ótima ação para a inibição de *S. mutans* sem efeitos colaterais.

Zoccolillo et al. (2016) estudaram a inibição do biofilme de *S. mutans* (ATCC 10449) cultivados em diferentes corpos-de-prova de vidro, titânio e acrílico, após tratamento com TFD associado com o fotossensibilizador Purpurina. Os resultados deste trabalho demonstraram que no grupo com corpos-de-prova em acrílico todas as intensidades de luz (15, 30, e 45 J) causaram uma inibição maior que 3 log, já as de vidro, só as irradiações de 30 e 45J apresentaram redução maior que 3 log. Em titânio essas mesma densidades de energia fizeram uma inibição um pouco maior que 2 log. No presente trabalho foi utilizado a densidade de energia de 15J, e apesar dela ser menor do que as que alcançaram efeito no trabalho citado, alcançou resultados antibacterianos superiores, em todos os testes com os três fotossensibilizadores testados.

Teixeira et al. (2012) avaliaram o efeito da TFD em biofilme de cepa ATCC UA159 de *S. mutans* em discos de hidroxiapatita com associação ao Azul de Toluidina. Após o tratamento, não observaram diferença entre os grupos só luz e só fotossensibilizador quando comparados ao grupo controle, mas o grupo TFD apresentou uma redução pela metade (5 log) nas células viáveis. Esse estudo foi muito semelhante ao nosso, porém os resultados ficaram aquém do alcançado no presente trabalho, onde o grupo da TFD com AM reduziu um pouco menos que a metade (4 log), o PZD reduziu um pouco mais que a metade (6 log) e o FTC que inibiu 100% das células viáveis na contagem de UFC/mL.

Freitas-Pontes et al. (2012) avaliaram o efeito da TFD com AM contra biofilme, *S. mutans* (ATCC 25175), formados sobre a superfície de resina acrílica, verificando que o grupo só AM apresentou redução um pouco maior que 1 log e no grupo tratamento não houve diferença estatística quando comparado ao grupo só AM. Segundo Nemezio et al. (2017) e Quishida et al. (2016), para um fotossensibilizador ser considerado ideal, ele não deve apresentar toxicidade no escuro para tecidos e células humanas, mas diante da necessidade de erradicar micro-organismos patológicos bucais com o mínimo de aparato possível, a toxidade no escuro para as bactérias no ponto de vista odontológico vem a ser interessante. Apesar de pouco encontrada nos estudos, Tonon et al. (2015) observaram uma leve redução de micro-organismos no grupo que só continha curcumina sem a irradiação. No presente trabalho, os fotossensibilizadores derivados da Clorina também apresentaram citotoxicidade no escuro para *S. mutans* em todos os testes, já o grupo AM+L- não apresentou citotoxicidade na maioria dos grupos, entretanto no teste em formação de biofilme as cepas clínicas 3 e 11 apresentaram uma pequena inibição de crescimento na contagem de UFC/mL.

Ao realizar o teste da TFD sobre biofilme de cepas clínicas de *S. mutans*, conseguimos observar a diferença de comportamento entre cepas clínicas e ATCC diante do tratamento, e até mesmo a diferença entre as cepas clínicas. Pontos interessantes foram encontrados, como uma pequena citotoxicidade no escuro do AM que foi encontrado na cepa 3 e 11. A resistência da cepa 6 ao tratamento com o AM e sua vulnerabilidade em resposta tanto do TFC no escuro quanto no tratamento são pontos muito interessantes também. Mesmo diante das especificidade de cada cepa, conseguimos observar redução muito mais significativa no grupo TFD com

FTC do que os alcançados com diferentes fotossensibilizadores com cepas ATCC que a literatura mostra. Isso demonstra que o FTC vem a ser um fotossensibilizador promissor para inibição do crescimento de *S. mutans* no escuro e principalmente com a ação da luz.

Nas imagens de MEV conseguimos observar nos grupos F-L-, F-L+ e AM+L agregados celulares grandes e densos de *S. mutans* com poucas lacunas entre as massas recobrimdo todo o corpo-de-prova. Nos grupos AM+L+, PDZ+L- e FTC+L- é possível visualizar rupturas nesses agregados celulares e maiores lacunas entre as massas. Já nos grupos PDZ+L+ e FTC+L+ a inibição do crescimento desses agregados celulares é de fácil visualização, no grupo FTC+L+ a inibição foi tão eficaz que é possível visualizar as ranhuras presente no esmalte dentário bovino. Resultados semelhantes pode ser observados nos trabalho de Misba et al. (2016) e Pereira et al. (2011) que observaram nas imagens de MEV uma redução da massa do biofilme após irradiação com diferentes fotossensibilizadores.

Os resultados obtidos na MEV confirmaram os achados da contagem de UFC/mL indicando que a TFD com fotossensibilizadores derivados da Clorina e₆ (PDZ e FTC) é capaz de inibir as células de *S. mutans* e reduzir os biofilmes formados sobre a superfície do esmalte

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Em todas as amostras coletadas de lesões de cáries ativas foi possível isolar cepas de *S. mutans*;

- Tanto a cepa padrão de *S. mutans* com as cepas clínicas foram sensíveis à TFD aplicada em culturas planctônicas e em biofilmes formados na superfície do esmalte de dentes bovinos;

- A TFD com os três fotossensibilizadores testados (AM, PDZ e FTC) foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *S. mutans* e desestruturar a arquitetura dos biofilmes;

- A TFD com fotossensibilizadores derivados da Clorina foi mais eficaz sobre *S. mutans* do que a TFD com Azul de Metileno;

- Entre os fotossensibilizadores de Clorina, o FTC foi mais eficaz do que o PDZ, conseguindo atingir completa eliminação das células de *S. mutans*;

- O FTC apresentou maior capacidade de penetração nas células de *S. mutans* do que o AM.

Portanto, os fotossensibilizadores derivados da Clorina e₆ (PDZ e FTC) apresentam potencial para serem utilizados na TFD para prevenção e tratamento da cárie dentária.

REFERÊNCIAS*

- Abdel Gaber SA, Müller P, Zimmermann W, Hüttenberger D, Wittig R, Abdel Kader MH, et al. ABCG2-mediated suppression of chlorin e6 accumulation and photodynamic therapy efficiency in glioblastoma cell lines can be reversed by KO143. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017;178:182–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.035>
- Annunzio SR De, Freitas LM De, Fontana CR. Terapia fotodinâmica antimicrobiana in vitro mediada por clorina-e6 contra *Propionibacterium acnes*. *Rev Ciências Farm Básica e Apl*. 2017;38:4532.
- Bao X, De Soet JJ, Tong H, Gao X, He L, Van Loveren C, et al. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* in biofilms at both neutral pH and cariogenic conditions. *PLoS One*. 2015;10(6):1–11.
- Benvindo RG, Braun G, Carvalho AR De, Bertolini GRF. Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro. *Fisioter e Pesqui*. 2008;15(1):53–7.
- 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.
- Calvete MJF, Gomes ATPC, Moura NMM. Chlorins in Photodynamic Therapy - Synthesis and applications. *Rev Virtual Química*. 2009;1(2):92–103. doi: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20090012>
- Campos MI da C, Campos CN, Vitral RWF. O uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas odontológicas: uma revisão da Literatura. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2008;8(1):127–32.
- Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *HHS Public Access*. 2016;26(5):1011–4.
- Cesar A, Rosa B. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*. 2005;25(2):239–52.
- Cheon K, Moser S, Wiener H, Whiddon J, Momeni S, Ruby J, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Growth (Lakeland)*. 2013;301(1):1–7. doi:10.1111/eos.12044
- Clarke JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. *Inst Pathol Res*. 1924;141–7.

* 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 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Costa ACBP, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AKDS, Beltrame Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz Oral Res.* 2010;24(4):413–8.

Cunha MC, Ribeiro AO. Síntese e caracterização de clorinas. Estudo das Propriedades da Terapia Fotodinâmica. 2007;1–3.

Da Hora Machado AE. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000;23(2):237–43.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St. Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012;3:1–16.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006;51(11):1024–8.

de Moraes M, Vasconcelos RC, Longo JPF, Muehlmann LA, de Azevedo RB, de Araújo Júnior RF, et al. Photodynamic therapy using chloro-aluminum phthalocyanine decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;167:208–15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.031>

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: <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2013.827668>

Dunbar LM, Tang DM, Manausa RM. A review of telavancin in the treatment of complicated skin and skin structure infections (cSSSI). *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):235–44.

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.

Falla-Sotelo FO, Rizzutto MA, Tabacniks MH, Added N, Barbosa MDL, Markarian RA, et al. Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. *Brazilian J Phys.* 2005;35(3b):761–2.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio CI, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque- derived biofilms. *NIH Public Access* 2009;44(6):751–9. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01187.x.

Freitas-Pontes KM, Gomes CEDA, De Carvalho BMDF, Sabóia RDSC, Garcia BA. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. *J Prosthet Dent.* 2012;112(3):632–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prosdent.2014.01.001>

Garcez AS, Neto JGA, 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 Photodyn Ther.* 2015;12(4):575–80.

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):34029. doi: 10.1117/1.2745982

Guerra RF. Utilização de dentes bovinos como possível substituto aos dentes humanos nos testes in vitro: revisão de literatura. *UFES Rev Odontol.* 2008;10(2):58–63.

Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(2):80–4.

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.

Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol.* 2010;85(4):501–11.

Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res.* 2010;44(2):116–26.

Kreth J, Justin M, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7193–203.

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>

Leite HLA, Cavalcante SIA, de Sousa EM, Gonçalves LM, Paschoal MA. *Streptococcus mutans* photoinactivation using a combination of a high potency photopolymerizer and rose bengal. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;15:11–2.

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;11(3):4–11.

Marsh PD, Head DA, Devine DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial

community - Implications for treatment. J Oral Biosci. 2015;57(4):185–91.

Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. Mutation of luxs affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. American Society Microbiology. 2003;71(4):1972–9. doi: 10.1128/IAI.71.4.1972–1979.2003

Misba L, Kulshrestha S, Khan AU. Antibiofilm action of a toluidine blue O-silver nanoparticle conjugate on *Streptococcus mutans*: a mechanism of type I photodynamic therapy. Biofouling; 2016;32(3):313–28. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2016.1141899>

Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;20(May):234–7.

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.

Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 2013;47(2):89–102.

Panhóca VH. Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* em biofilme dental “in situ” [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade Federal de São Carlos; 2011.

Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013;10(3):313–9.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, MacHado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: An in vitro study Lasers Med. Sci. 2011;26(3):341–8.

Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, López SC, García-Luque I, Revillo MJ, et al. Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;19:98–102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.05.017>

Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quim Nova. 2007;30(4):988–94.

Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa M, Pietruski JK, Doliska E, et al. Clinical evaluation of photodynamic therapy efficacy in the treatment of oral leukoplakia. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014;11(1):34–40.

Quishida CCC, Carmello JC, Mima EGO, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC.

Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015a;30(2):685–94.

Quishida CCC, de Oliveira Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine® and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med Sci.* 2015b;30(9):2303–12.

Quishida CCC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016;31(5):997–1009. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1942-7>

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.

Ribeiro JN, Jorge RA, Da Silva AR, Flores AV, Ronchi LM, Tedesco AC. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclet Quim.* 2007;32(1):7–14.

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.

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.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LKA, Saxena D, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res.* 2012;46(6):549–54.

Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Tahari S, Zangeneh N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlo- rin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *S Int J Dent. Sci. Res.* 2011;8(2):48–54.

Vohra F, Al-Kheraif AA, Qadri T, Hassan MIA, Ahmed A, Warnakulasuriya S, et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(1):150–9.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64–9.

Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med.* 2016;48(10):995–1005.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética

Título da Pesquisa: Clorina como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans*
Pesquisador Responsável: Maira Terra Garcia
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 64177816.4.0000.0077
Submetido em: 28/03/2017
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: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_833437