

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

INATIVAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*
UTILIZANDO TERAPIA FOTODINÂMICA

LIA BORGES LEÃO BAZAGA

UBERABA – MG
OUTUBRO / 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LIA BORGES LEÃO BAZAGA

**INATIVAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* UTILIZANDO
TERAPIA FOTODINÂMICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do *Título de Mestre*

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

Uberaba – MG
Outubro / 2009

***Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro***

B348i Bazaga, Lia Borges Leão
Inativação de *Streptococcus mutans* utilizando Terapia Fotodinâmica /
Lia Borges Leão Bazaga. -- 2009
78 f. : graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

1. *Streptococcus mutans*. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Eosina. 4. Rose
Bengal. I. Título. II. Thedei Júnior, Geraldo.

CDU 579.862

LIA BORGES LEÃO BAZAGA

**INATIVAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* UTILIZANDO
TERAPIA FOTODINÂMICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do *Título de Mestre*

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

Uberaba, 30 de outubro de 2009

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Carlos Hueb de Menezes

Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, que me concedeu o dom da vida e me ilumina e guia nessa jornada.

Agradecer também aos meus pais, meu marido, minha família e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Obrigada por vocês existirem em minha vida!

Ao meu orientador, professor Dr. Geraldo Thedei Júnior, que sempre me acompanhou, ensinou, aconselhou, estando presente e com total disponibilidade em todos os momentos dessa etapa. Professor saiba que minha admiração pelo seu trabalho e sua competência é enorme e minha gratidão é eterna.

Ao professor Dr. Tony de Paiva Paulino, pelo conhecimento, paciência e amizade a mim ofertados.

À Universidade de Uberaba, por conceder seus laboratórios para a realização desse trabalho.

Agradecer aos meus colegas de laboratório, Cássia, Alexandre, Fernanda, Henrique, Igor, Andrea, Gabriela, Hilara, Marielles, que permitiram esse trabalho ficar mais alegre.

Aos meus colegas pós-graduandos, principalmente, Cláudia Renata e Renata Paes, por dividirem os momentos de angústia e conquistas.

Aos meus amores, Cindy, Bob e Ayka, por me proporcionarem felicidade todos os dias!

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista à confiança incondicional de minha mãe em mim! Mãe, você me ensinou e me ensina o que há de melhor na vida!

Ao meu pai, pelo apoio constante em minha vida! Pai, obrigada por existir!

Ao amor, carinho, respeito e companheirismo de meu marido Murilo! Meu amor, sem você minha existência seria incompleta!

*“Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las
Que triste os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi desenvolvido com recursos financeiros da Universidade de Uberaba (PAPE – FAPEMIG 2007/011). A aluna Lia Borges Leão Bazaga recebeu bolsa de Mestrado oferecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O Laboratório de Bioquímica de Microrganismos conta com o apoio da FAPEMIG (Projeto CDS-APQ 2542-4.08/07).

RESUMO

Streptococcus mutans é um dos principais agentes causadores da cárie dental e um importante patógeno oral, devido sua acidogenia, acidurância e capacidade de formação de biofilmes. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica na qual uma luz visível, um corante e oxigênio interagem e levam à produção de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO's). Essas substâncias podem causar uma seqüência de eventos biológicos, resultando numa possível morte ou inativação celular. O objetivo desse trabalho foi verificar e determinar a influência da Terapia Fotodinâmica aplicada “*in vitro*” sobre o microorganismo *Streptococcus mutans* crescendo como uma suspensão celular e na forma de biofilme. *S. mutans* foi cultivado em meio líquido em tubos de ensaio ou em placas de cultura de células com 24 poços, utilizando-se o meio completo suplementado com sacarose. As drogas testadas, Eosina e Rose Bengal, pertencem à classe dos xantenos. Os testes de toxicidade no escuro para células em suspensão empregaram concentrações variando de 5×10^{-5} a 5×10^{-7} mol/L para ambos os corantes, enquanto os testes em biofilmes empregaram concentrações de 0,8 à $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L para Eosina e 6,6 à $53,3 \times 10^{-7}$ mol/L para Rose Bengal. Foram usados como fonte de luz o Fotopolimerizador de Luz Halógena (FLH) e o LED (luz emitida por diodo), com tempos de irradiação variando de 15 a 65 segundos. Os efeitos da TFD em suspensão de células foram determinados plaqueando-se as células em meio sólido após cada tratamento. Os efeitos da TFD em biofilmes foram determinados pela redução da capacidade acidogênica dos biofilmes. Os resultados obtidos indicam que a Eosina apresenta maior toxicidade no escuro do que o Rose Bengal, tanto para crescimento planctônico quanto para biofilmes. Utilizando-se 5×10^{-7} mol/L de Eosina com FLH e LED ou 5×10^{-6} mol/L de Rose Bengal com FLH e LED, obteve-se 100% de morte celular para culturas planctônicas. Para culturas em biofilmes, a maior redução da atividade metabólica foi obtida com $0,8 \times 10^{-7}$ mol/L de Eosina e 65 segundos de irradiação com LED. Não foi observada redução total da atividade metabólica quando se utilizou a TFD em biofilmes nas condições empregadas no presente estudo. Em conclusão, podemos afirmar que, entre as condições empregadas para *S. mutans*, a Eosina associada com o LED é a melhor estratégia para a inativação de células planctônicas e também para a redução da atividade metabólica de biofilmes.

Palavras-Chave: *Streptococcus mutans*, Terapia Fotodinâmica, Eosina, Rose Bengal.

ABSTRACT

Streptococcus mutans is among the main caries forming organisms and an important oral pathogen, due to its acidogeny, acidurance and biofilm forming capacity. Photodynamic Therapy is a therapeutic modality in that a visible light, a drug and oxygen interacts, leading to the production of different Reactive Oxygen Species (ROS's). These substances may cause a sequence of biological events, resulting in a possible death or cellular inactivation. The objective of that work was to verify and to determine the influence of the Photodynamic Therapy applied "in vitro" on the microorganism *Streptococcus mutans* grown as a cell suspension and as biofilms. *S. mutans* was grown in liquid medium in test tubes or culture plates with 24 wells, using complete medium supplemented with sucrose. The drugs used belong to the xantene group. The dark toxicity tests for suspension of cells used concentrations ranging from 5×10^{-5} to 5×10^{-7} mol/L to both drugs, whereas tests in biofilms used concentration ranging from 0,8 to $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L from Eosin and 6,6 to $53,3 \times 10^{-7}$ mol/L from Rose Bengal. Light sources used were Hand Held Photopolymerizer (HHP) and Light Emitted by Diode (LED), with irradiation times ranging from 15 to 65 seconds. The effects of PDT in suspension cells were determined after plating cells in solid medium after each treatment. The effects of PDT in biofilms were determined through reduction of biofilm's acidogenic capacity. The results we obtained indicates that Eosin presents higher dark toxicity than Rose Bengal, for both planktonic and biofilms. Using 5×10^{-7} mol/L from Eosin with FLH and LED or 5×10^{-6} mol/L from Rose Bengal with FLH and LED, we obtained 100% cell death for planktonic cultures. For biofilm growing cells, the higher metabolic activity reduction was obtained with $0,8 \times 10^{-7}$ mol/L from Eosin and 65 seconds of irradiation with LED. It was not observed total reduction of metabolic activity when PDT was applied to biofilms in conditions we used in the present study. In conclusion, we may affirm that, among conditions tested to *S. mutans*, Eosin associated with LED is the best strategy to inactivation of planktonic and also to reduction of biofilm's metabolic activity.

Keywords: *Streptococcus mutans*, Photodynamic Therapy, Eosin, Rose Bengal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de Keyes, proposto em 1969.	17
Figura 2	Diagrama de Newbrum (1983)	18
Figura 3	<i>Streptococcus mutans</i> sobre superfície dentária (3.000X em M.O.C.).	19
Figura 4	Aspecto macroscópico de colônias de <i>S. mutans</i> após crescimento em meio sólido suplementado com glicose (esquerda) e sacarose (à direita).	20
Figura 5	Esquema da aplicação da TFD: luz ativando o fotossensibilizador na presença de O ₂ , produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e morte das células-alvo.	24
Figura 6	Reação tipo I: formação de radicais livres ([•] O ₂) através da transferência de elétrons entre o fotossensibilizador (FS) no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando ânion-radical superóxido ([•] O ₂ ⁻).	25
Figura 7	Reação tipo II: transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete (³ S ₁ [*]) com formação de oxigênio singlete (¹ O ₂).	25
Figura 8	Estrutura química da Rose Bengal	28
Figura 9	Estrutura química da Eosina Y	28
Figura 10	Padrão de emissão de luz pelo LED (□) e de absorção de luz pelas drogas Eosina (●) e Rose Bengal (■).	38
Figura 11	Padrão de emissão de luz pelo FLH (□) e de absorção de luz pelas drogas Eosina (●) e Rose Bengal (■).	39
Figura 12	Toxicidade da Eosina sobre <i>S. mutans</i> crescendo em meio planctônico. (*p<0,01).	40
Figura 13	Toxicidade do Rose Bengal sobre <i>S. mutans</i> crescendo em meio planctônico. (*p<0,01).	40
Figura 14	Efeito da TFD com Eosina (5x10 ⁻⁷ mol/L) e FLH (60 segundos de irradiação) sobre <i>S. mutans</i> crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (*p<0,01).	41
Figura 15	Efeito da TFD com Eosina (5x10 ⁻⁷ mol/L) e LED (65 segundos de irradiação) sobre <i>S. mutans</i> crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (*p<0,01).	42

Figura 16	Efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e FLH (60 segundos de irradiação) sobre <i>S. mutans</i> crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).	43
Figura 17	Efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e LED (65 segundos de irradiação) sobre <i>S. mutans</i> crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).	43
Figura 18	Padrão de acidificação do <i>S. mutans</i> em placas de cultura contendo meio completo líquido suplementado com sacarose.	44
Figura 19	Atividade acidogênica do biofilme após remoção do meio de cultura, lavagem do biofilme e adição de um meio de cultura novo.	44
Figura 20	Toxicidade de luz emitida pelo LED sobre o biofilme de <i>S. mutans</i> . Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle.	45
Figura 21	Toxicidade de luz emitida pelo FLH sobre o biofilme. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle.	45
Figura 22	Atividade metabólica de biofilmes de <i>S. mutans</i> tratados com diferentes concentrações de Eosina. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).	46
Figura 23	Atividade metabólica de biofilmes de <i>S. mutans</i> tratados com diferentes concentrações de Rose Bengal. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).	47
Figura 24	Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Rose Bengal, utilizando 60 segundos de irradiação com FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).	48
Figura 25	Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Rose Bengal, utilizando 65 segundos de irradiação com LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).	48
Figura 26	Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Eosina utilizando 60 segundos de irradiação com FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).	49
Figura 27	Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Eosina utilizando 65 segundos de irradiação com LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).	50
Figura 28	Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina e FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).	51

- Figura 29** Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina e LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (*p<0,01). 51
- Figura 30** Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal e LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (*p<0,01). 52
- Figura 31** Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal e FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (*p<0,01). 53

LISTA DE ABREVIATURAS

CPO-D	CPO-D = número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados. A letra D do acrônimo utilizado na denominação do índice refere-se a “dentes examinados”, para diferenciar este indicador de outro que trata de “superfícies dentárias examinadas” (CPO-S).
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FeSO ₄	Sulfato de Ferro II
FLH	Fotopolimerizador de Luz Halógena
K ₂ HPO ₄	Fosfato Monoácido de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato Biácido de Potássio
LED	Luz Emitida por Diodo
MgSO ₄	Fosfato de Magnésio
MnCl ₂	Cloreto de Manganês II
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC's	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CÁRIE DENTAL E <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	16
1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA	23
1.3 AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES	26
1.3.1 <i>Xantenos</i>	27
1.4 FONTES DE LUZ	28
2 HIPÓTESE	30
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 GRUPOS DE ESTUDO.....	32
4.2 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	32
4.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>S. MUTANS</i>	32
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	32
4.4.1 <i>Meio Completo</i>	32
4.4.2 <i>Meio TSB</i>	33
4.4.3 <i>Meio TSA</i>	33
4.5 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	34
4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	34
4.7 CRESCIMENTO DE <i>S. MUTANS</i> EM MEIO PLANCTÔNICO	34
4.8 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO AGENTE FOTOSSENSÍVEL A SER EMPREGADO NOS EXPERIMENTOS.....	35
4.9 EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA APÓS CRESCIMENTO EM MEIO PLANCTÔNICO.....	35
4.10 CRESCIMENTO DO BIOFILME DE <i>S. MUTANS</i> EM PLACA DE POLIESTIRENO	36
4.11 EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM BIOFILME FORMADO POR <i>S. MUTANS</i>	36
4.12 FONTES DE LUZ	37
4.13 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS BIOFILMES	37
4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37

5 RESULTADOS	38
5.1 ESPECTRO DE EMISSÃO E ABSORÇÃO DE LUZ.....	38
5.1.1 <i>Emissão de Luz pelas fontes empregadas</i>	38
5.2 TOXICIDADE DE EOSINA E ROSE BENGAL SOBRE S. MUTANS CRESCENDO EM MEIO PLANCTÔNICO	39
5.3 EFEITO DA TFD COM EOSINA E ROSE BENGAL EM MEIO PLACTÔNICO DE S. MUTANS ...	41
5.4 CURVA DE ACIDOGENIA DE S. MUTANS EM BIOFILME	43
5.5 TOXICIDADE DE LUZ SOBRE O BIOFILME	45
5.6 TOXICIDADE DAS DROGAS SOBRE O BIOFILME	46
5.7 EFEITO DA TFD COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ROSE BENGAL E EOSINA SOBRE BIOFILMES DE S. MUTANS.....	47
5.8 EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO PARA BIOFILMES TRATADOS COM EOSINA	50
5.9 EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO PARA BIOFILMES TRATADOS COM ROSE BENGAL.....	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	61
8 REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	68

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 A saúde bucal no Brasil tem apresentado melhoras significativas nas últimas
4 décadas, entretanto a doença cárie continua apresentando alta prevalência ainda nos dias
5 atuais. De acordo com o levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2003
6 (Projeto SB Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira), o valor do CPO-
7 D¹ aos 12 anos obteve média igual ou menor que 3 nas regiões Sul e Sudeste. Este estudo
8 avaliou também o acesso aos serviços odontológicos e a cobertura por água fluoretada,
9 mostrando que as condições são desiguais para os brasileiros (BRASIL, 2004).

10 Inúmeras pesquisas buscam esclarecer as correlações entre a cárie dentária, a
11 presença de microrganismos, o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva e a dieta
12 cariogênica, representada principalmente pela sacarose. A presença de microrganismos na
13 cavidade bucal, como o *Streptococcus mutans* não é o único fator determinante no
14 desenvolvimento das lesões, apesar da importância deste componente. Além da dieta
15 cariogênica e de outros fatores relacionados, a participação deste microrganismo na lesão
16 cariosa é inquestionável e indispensável, uma vez que o metabolismo bacteriano produz
17 ácidos que provocam a desmineralização do esmalte, o que torna *S. mutans* um importante
18 participante na etiologia da cárie (LIMA, 2007).

19 De acordo com Yamada Jr.; Hayek e Ribeiro (2004), a terapia com antibióticos e
20 antissépticos locais pode ser indicada quando os métodos convencionais falham, mas existe
21 o risco de que a resistência bacteriana possa ser induzida quando tais agentes são utilizados
22 por longo período de tempo.

¹ CPO-D = número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados. A letra D do acrônimo utilizado na denominação do índice refere-se a “dentes examinados”, para diferenciar este indicador de outro que trata de “superfícies dentárias examinadas” (CPO-S).

23 Uma das alternativas nos tratamentos médicos e odontológicos é a utilização de
24 lasers em associação com drogas que absorvem comprimentos de ondas específicos, com
25 efeitos destrutivos contra microrganismos e células tumorais. Essa modalidade terapêutica,
26 denominada Terapia Fotodinâmica (TFD), foi utilizada inicialmente para tratamento de
27 câncer, mas seu uso tem sido pesquisado e estendido para outras finalidades, como o
28 tratamento de doenças infecciosas e terapias odontológicas (ACKROYD *et al.*, 2001;
29 LIMA, 2007).

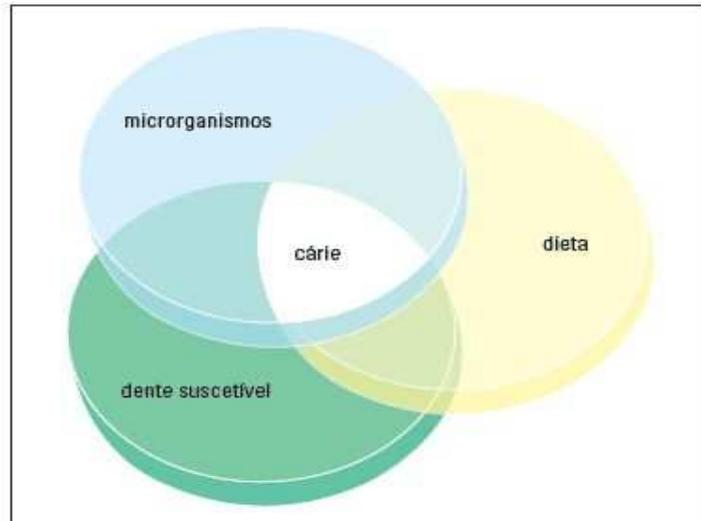
30

31 **1.1 Cárie dental e *Streptococcus mutans***

32

33 Em 1924 Kilian Clarke localizou, em lesões cariogênicas, pequenos cocobacilos
34 de formato oval e distribuído em cadeia, nomeando-os *Streptococcus mutans* (CLARKE,
35 1924; BUISCHI, 2000). Em 1946 Mc Clure e Hewit (apud MALTZ, 1997) comprovaram
36 que as bactérias eram responsáveis pelas cáries, sendo esses achados confirmados por
37 Orland *et al.* (1954 apud MALTZ, 1997), que realizaram pesquisas com grupos de ratos
38 com germes e livres de germes, em dieta cariogênica. Em 1960 Keyes comprovou a
39 transmissibilidade da cárie e afirmou em 1969 que havia pelo menos três fatores
40 envolvidos neste processo, propondo o Diagrama de Keyes, o clássico esquema dos três
41 círculos superpostos ilustrado na Figura 1 (SANTOS; SOVIERO, 2002; KEYES, 1960).

42



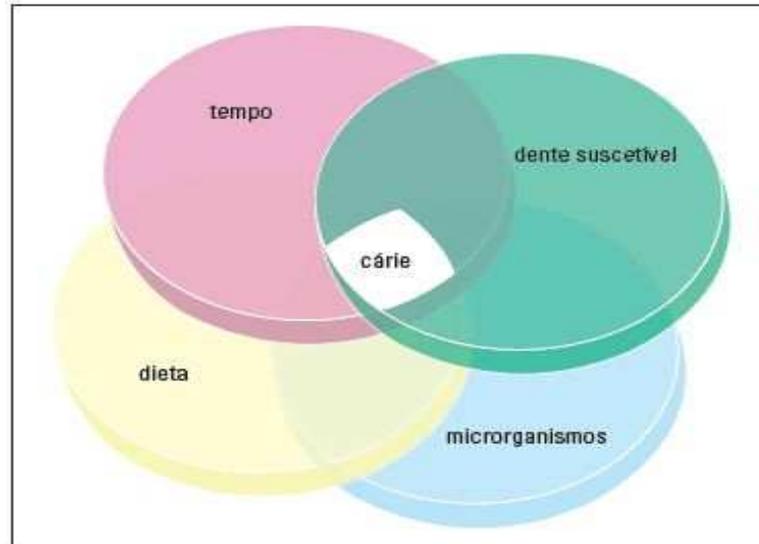
43
44
45
46
47

Figura 1: Diagrama de Keyes, proposto em 1969.
Fonte: Lima (2007, p. 121)

48 Assim, o conceito de que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa,
49 transmissível e dieta-dependente, que produz desmineralização das estruturas dentárias é
50 embasado na interação de fatores como suscetibilidade do hospedeiro, microrganismo e
51 substrato oral, determinando a doença cárie (FITZGERALD; KEYES, 1960, KEYES,
52 1960).

53 Na década de 80, Ernest Newbrum elaborou a modificação subliminar da tríade de
54 Keyes, acrescentando o tempo como o quarto fator envolvido na cárie dental, devido ao
55 fato de que a cárie é uma doença crônica e multifatorial, conforme ilustrado na Figura 2
56 (NEWBRUN, 1983; 1988).

57



58

59

60

61

Figura 2: Diagrama de Newbrum (1983).

Fonte: Lima (2007, p. 121)

62

63

64

O termo cariogênico é aplicado apenas a algumas cepas de estreptococos capazes de produzir cáries em animais e/ou em seres humanos. De acordo com Williams e Elliott (1979), os aspectos mais significantes relativos às bactérias cariogênicas são:

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

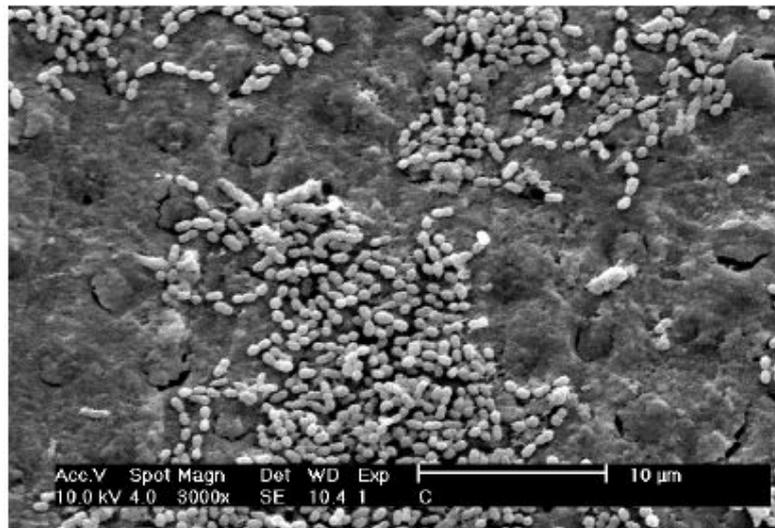
75

- A capacidade de fermentar carboidratos e conseqüentemente reduzir o pH para aproximadamente 4-5, que é o índice no qual ocorre desmineralização do esmalte dental).
- A capacidade de produzir uma reserva de polissacarídeos a partir de açúcares da dieta, utilizando-a como substrato de fermentação quando os carboidratos exógenos não estão disponíveis. As cepas capazes de armazenar estes polissacarídeos intracelulares são capazes de produzir ácidos por maiores períodos que cepas que não produzem essas reservas de energia.
- A capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares que permitem às células aderirem entre si e na superfície da parede dos dentes. Alguns polissacarídeos (dextranos) são formados principalmente a partir da sacarose.

76 Os *Streptococcus mutans* é a bactéria mais comum na boca e também produtoras
77 de ácido, sendo conseqüentemente cariogênicas. Dentre os estreptococos causadores de
78 cáries podem ser citados também *S. sobrinus*, mas *S. mutans* são considerados os mais
79 cariogênicos (WILLIANS; ELLIOTT, 1979; MARSH, 2003).

80 *S. mutans*, sendo um dos principais agentes causadores da cárie dental, é um
81 importante patógeno oral, devido sua capacidade de aderência a superfícies teciduais,
82 formação de biofilme e adaptação a condições de estresse oxidativo e pH baixo (DALE;
83 SEBULSKY; HEINRICHS, 2004). Estas bactérias Gram positivas apresentam diâmetro
84 médio de 0,5 a 2,0 µm, formato esférico ou ovóide e são dispostas em pares ou em cadeias
85 (Figura 3). Em meios sólidos formam colônias regulares quando a fonte de carbono é a
86 glicose e irregulares quando a fonte de carbono é a sacarose, como pode ser observado na
87 Figura 4.

88



89

90

91

Figura 3: *Streptococcus mutans* sobre superfície dentária (3.000X em M.O.C.).
Fonte: Bengtson (2007, p. 71).

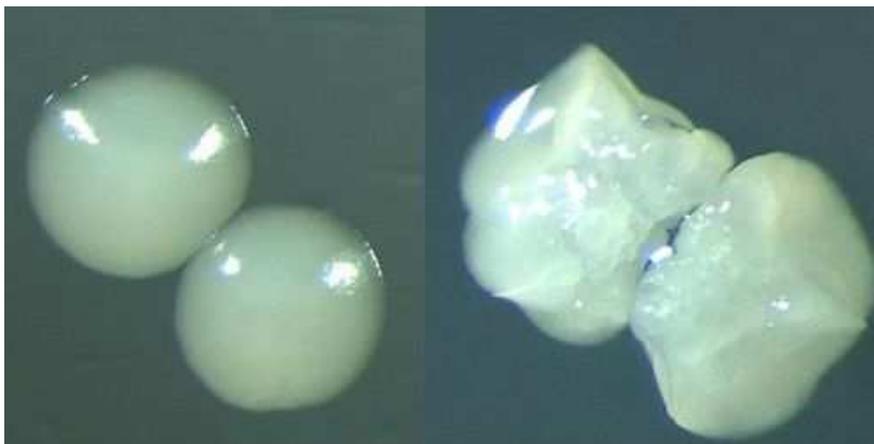


Figura 4: Aspecto macroscópico de colônias de *S. mutans* após crescimento em meio sólido suplementado com glicose (esquerda) e sacarose (à direita).

Fonte: Thedei Jr., G. (material não publicado)

92
93
94
95
96
97

98 Kolenbrander (2000) explica que a formação do biofilme dental é a etapa inicial
99 no desenvolvimento da cárie e das infecções periodontais. Este processo ocorre em duas
100 fases: inicialmente, bactérias com carga negativa podem alcançar uma superfície natural
101 que também possui carga negativa. Em seguida, na segunda fase, o biofilme acumula
102 bactérias por coagregação com a mesma espécie ou ainda com outras espécies, através de
103 mecanismos e estruturas como glicocálice, adesinas, pili, além da produção de matriz
104 polissacarídica extracelular.

105 *S. mutans* sintetiza polímeros de α -glucan intracelular e extracelular, solúvel e
106 insolúvel (glucano), pela ação da enzima glicosiltransferase, utilizando a sacarose como
107 fonte de carbono. O glucano apresenta forças repulsivas estabelecendo a ligação do
108 microrganismo de forma irreversível ao dente, favorecendo a placa bacteriana. A
109 permanência da placa bacteriana na superfície do esmalte dental promove perda de
110 minerais do dente pela ação dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano,
111 ocasionando assim o início da cárie dental (MARSH; BRANDSHAW, 1990; HASSAN;
112 FRANK; QVIST, 2002; TENUTA *et al.*, 2003).

113 Os ácidos decorrentes do metabolismo bacteriano atuam reduzindo o pH da placa
114 bacteriana e ligam-se às hidroxilas da hidroxiapatita favorecendo a formação de fosfato de

115 cálcio e a subsequente dissolução do esmalte dental (DAWES, 2003; WUNDER, BOWEN,
116 1999).

117 Tanto o *S. mutans*, o *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do
118 grupo *mutans* são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que
119 hidrolisam a sacarose da dieta em glicose e frutose. Os resíduos de glicose unem-se por
120 meio de ligações glicosídicas formando glucanos insolúveis, que conferem aos
121 microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do
122 biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos
123 glucanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, promovem a
124 desmineralização do esmalte dentário, reduzem o pH da placa bacteriana; ácidos gerados
125 ligam-se as hidroxilas da hidroxiapatita, favorecendo a formação de fosfato de cálcio e a
126 dissolução do esmalte dentário e dando início a instalação da cárie (LOESCHE, 1986;
127 STAMFORD *et al.*, 2005).

128 Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem
129 como mecanismos de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido
130 à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular,
131 produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares. (HOMER;
132 WHILEY; BEIGHTON, 1990, HARRINGTON; RUSSEL, 1994; JACKSON; LIM; DAO,
133 1997; BARBIERI, 2005).

134 Por outro lado, apesar de que outros estreptococos bucais, incluindo *S. sanguis*, *S.*
135 *salivarius* e possivelmente *S. gordonii*, também possam sintetizar estes polissacarídeos,
136 apenas os estreptococos do grupo *mutans* apresentam aumento de colonização induzido
137 pela sacarose. Além disso, *S. mutans* também parecem produzir maior quantidade de
138 ácidos a partir de carboidratos, do que outras bactérias bucais, porque são capazes de
139 fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos do que outros

140 estreptococos bucais. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos
141 intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de
142 carboidratos fermentáveis exógenos (BARBIERI, 2005).

143 A aderência de *S. mutans* à superfície dental facilita a colonização de outros
144 patógenos orais e assim ocorre a formação de um biofilme bacteriano variado. No
145 ambiente do biofilme bacteriano, os *S. mutans* geram ácido lático como subproduto do
146 metabolismo do açúcar proveniente da dieta do hospedeiro, o que resulta em pH ácido e
147 em desmineralização do esmalte dental (DALE; SEBULSKY; HEINRICHS, 2004).

148 Por ter excelente característica acidogênicas e acidúricas o *S. mutans* é
149 considerado o principal e mais virulento micorganismo cariogênico (LEITÃO *et al.*, 2001;
150 RODRIGUES; FERNANDES; GUEDES-PINTO, 2003).

151 O biofilme forma-se naturalmente no dente e sua presença normalmente é
152 benéfica, pois contribui para estimular as defesas inatas do hospedeiro e atuando como
153 uma barreira contra outros microrganismos patogênicos. No biofilme sadio, encontram-se
154 muitas espécies bacterianas, tais como *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis* e *Actinomyces*
155 *naeslundii*, entre outros (MARSH, 1990).

156 Por outro lado, quando crescem na forma de biofilmes, as comunidades
157 bacterianas podem tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10 a 1000 vezes
158 maiores que o necessário para eliminar organismos planctônicos geneticamente iguais.
159 Além disso, são normalmente mais resistentes à fagocitose, o que torna mais difícil a sua
160 erradicação dos tecidos vivos (JEFFERSON, 2004).

161 *S. mutans* utiliza sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose e
162 produzindo assim energia pelo processo de fermentação, o qual gera ácido lático como
163 subproduto. Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são convertidas em
164 polissacarídeo intracelular de alto peso molecular, processo que proporciona

165 armazenamento de material para o metabolismo energético na ausência de substrato
166 exógeno. Além disso, *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem
167 hidratos de carbono da saliva para serem utilizadas como fonte de energia (BARBIERI,
168 2005).

169 A redução dos microrganismos patogênicos tem sido obtida com o emprego de
170 técnicas tradicionais, incluindo remoção mecânica e quimioterapia, sendo que o sucesso do
171 tratamento está diretamente associado à colaboração e motivação do paciente (FEREZ *et*
172 *al.*, 1999; OLSVIK; TENOVER, 1993).

173 Associado a estes fatores, o aumento da resistência à antibioticoterapia por
174 bactérias como *S. sobrinus* e *S. mutans* faz do desenvolvimento de técnicas
175 antimicrobianas alternativas, como a Terapia Fotodinâmica (TFD) um importante foco,
176 direcionado para a terapia da cárie e também para outras doenças onde a formação de
177 biofilme tem papel importante (MALIK; LADAN; NITZAN, 1992; ACKROYD *et al.*,
178 2001; LIMA, 2007).

179

180 **1.2 Terapia Fotodinâmica**

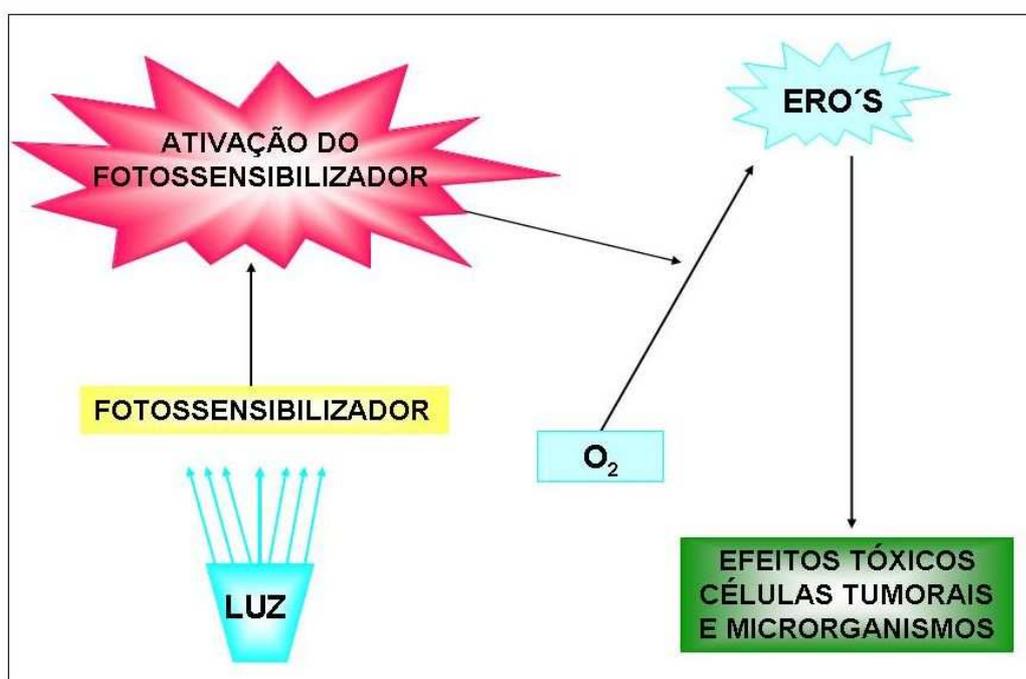
181

182 A TFD consiste na associação de um agente fotossensibilizante, normalmente
183 exógeno e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar a morte microbiana e tem sido
184 citada como mais um recurso na esterilização de feridas, preparos cavitários, redução de
185 bactérias intracanal e em bolsas periodontais (GARCEZ, 2002; YAMADA JR.; HAYEK;
186 RIBEIRO, 2004).

187 A Terapia Fotodinâmica (TFD) ou *Photodynamic Therapy* (PDT) é uma
188 modalidade terapêutica em que há a integração de uma luz visível com uma droga
189 (fotossensibilizador ou corante) e oxigênio, que normalmente está presente nos tecidos ou

190 meio reacional, com a finalidade de provocar injúria ou morte de células prejudiciais ao
191 organismo.

192 No caso específico da TFD, a primeira etapa consiste na administração de uma
193 droga (ou corante) ou uma pré-droga, o agente fotossensível. Em uma segunda etapa do
194 tratamento, os tecidos ou células doentes, que tiveram tempo suficiente para absorver o
195 corante são expostos a uma luz visível com um comprimento de onda específico, capaz de
196 excitar esse agente fotossensível. A interação da luz e do corante, na presença de oxigênio,
197 leva à produção de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO's) como, por exemplo, o
198 oxigênio singlete. Essas espécies reativas de oxigênio irão desencadear uma seqüência de
199 eventos biológicos, resultando na geração de moléculas tóxicas responsáveis pela morte
200 das células tumorais, conforme esquematizado na Figura 5 (GOMER *et al.*, 1989;
201 HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; SHARMAN *et al.*, 1999; KONOPKA; GOLINSKI,
202 2007).



203
204
205
206
207
208
209

Figura 5. Esquema da aplicação da TFD: luz ativando o fotossensibilizador na presença de O₂, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e morte das células-alvo.

Fonte: baseado em Konopka e Golinski (2007, p. 695).

210 A luz ativa o agente fotossensibilizador (corante) que reage com o oxigênio
 211 presente no meio, levando à produção de radicais livres (reação tipo I) ou ainda por
 212 transferência de energia ao oxigênio (reação tipo II), levando à produção de oxigênio
 213 singlete. Ambos os caminhos viabilizam a morte celular e a destruição do tecido doente
 214 (LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

215 **Reações tipo I:** Na presença de oxigênio encontrado nas células,
 216 fotossensibilizador (FS) ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por
 217 transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (Figura 6).

218



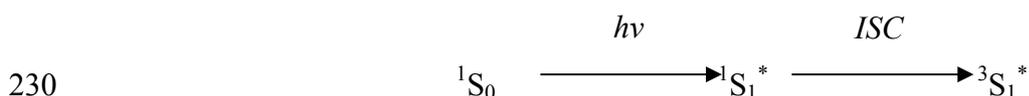
222 **Figura 6:** Reação tipo I: formação de radicais livres ($\cdot\text{O}_2$) através da
 223 transferência de elétrons entre o fotossensibilizador (FS) no estado triplete
 224 excitado e componentes do sistema, gerando ânion-radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).

225 **Fonte:** Perussi (2007)

226

227 **Reações tipo II:** Transferência de energia ao oxigênio, levando à produção de
 228 oxigênio singlete (Figura 7).

229



232 **Figura 7:** Reação tipo II: transferência de energia do fotossensibilizador no estado
 233 triplete (${}^3\text{S}_1^*$) com formação de oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$).

234 **Fonte:** Perussi (2007)

235

236 O processo é explicado pelo fato de que o oxigênio singlete reage com quase
237 todos os componentes celulares, uma vez que os compostos orgânicos insaturados são de
238 uma forma geral, suscetíveis à ação de $^1\text{O}_2$. (CARRÉ *et al.*, 1999).

239 Nos últimos anos, a potencialidade do uso de corantes fotossensíveis como
240 agentes no tratamento fotoquimioterápico de tecidos tumorais tem sido estudada,
241 definindo-se uma nova linha de ação nesta área. A TFD tem aplicação moderadamente
242 complexa, porque requer a dose certa da substância fotossensibilizadora, e a dose certa de
243 luz. A fonte luminosa, além de ser, necessariamente, móvel e dirigível apenas para a área
244 alvo, precisa ter a capacidade de gerar luz com comprimento de onda adequado e com
245 intensidade suficiente para ativar o fotossensibilizador. A TFD pode apresentar como
246 desvantagens a fraca especificidade na biodistribuição e o acúmulo do fotossensibilizador
247 em tecidos não neoplásicos (TOMÉ, 2002; CALVETE *et al.*, 2009).

248 A ação da TFD nas infecções orais em modelo experimental em animais tem sido
249 pesquisada, sendo observado que ocorre a redução de patógenos do biofilme dental e peri-
250 implantar concluindo-se, portanto, que a TFD é um tratamento não invasivo que pode ser
251 utilizado com aliado ao tratamento odontológico convencional (CAPELLA; CAPELLA,
252 2003; CARGNELLUTI, 2007).

253

254 **1.3 Agentes Fotossensibilizadores**

255

256 De acordo com Perussi (2007), diversos grupos de corantes podem ser utilizados
257 para finalidades específicas na Terapia Fotodinâmica:

- 258 • Porfirinas e Clorinas: tratamento de carcinomas;
- 259 • Ácido 5-aminolevulínico: tratamento de lesões tumorais e pré-tumorais, desordens
260 vasculares proliferativas, queratose actínica e carcinoma de células basais;

- 261 • Ftalocianinas: desinfecção de produtos do sangue;
- 262 • Fenotiazínicos (azul de toluidina O, azul de metileno): tratamento de câncer de
263 bexiga e de esôfago, virulências de pele, psoríase, adenocarcinomas, terapia
264 antimicrobiana;
- 265 • Riboflavina: desinfecção dos produtos do sangue, psoríase;
- 266 • Hipericina: psoríase e tratamentos de pele;
- 267 • Xantenos (Rose Bengal, Eosina Y, Fluoresceína e Eritrosina B): terapia
268 antimicrobiana.

269

270 **1.3.1 Xantenos**

271

272 Os Xantenos são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear
273 com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível. Uma
274 característica importante dos corantes xantenos é que não se ligam à membrana celular e
275 localizam-se no citoplasma. Alguns exemplos de xantenos são Rose Bengal, Eosina Y,
276 Fluoresceína e Eritrosina B (PAULINO, 2006; PERUSSI, 2007).

277 Rose Bengal (Figura 8) é um haleto derivado da fluoresceína que tem sido usado
278 em oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias doenças externas ao olho.
279 Como um FS, Rose de Bengal pode matar microrganismos, tais como vírus, bactérias e
280 protozoários, além de induzir efeitos fotodinâmicos *in vitro* em células vermelhas do
281 sangue, cardiomiocitos e células epiteliais do pigmento da retina. Em um ambiente aquoso
282 contendo nucleotídeos, o mecanismo fotodinâmico do Rose Bengal sob irradiação em 532
283 nm é predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singlete e os restantes 20%
284 de ânion superóxido O composto exibe uma potente atividade fototóxica antitumor *in vitro*
285 e *in vivo* (PERUSSI, 2007).

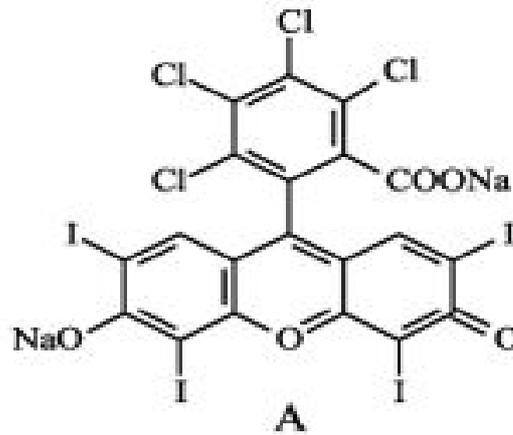


Figura 8 Estrutura química da Rose Bengal
Fonte: Perussi (2007, p. 989)

286
 287
 288
 289
 290

291 Eosina Y (Figura 9) é um derivado tetrabromo da fluoresceína e pode ser usado
 292 para corar o citoplasma, o colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio
 293 (PERUSSI, 2007).

294

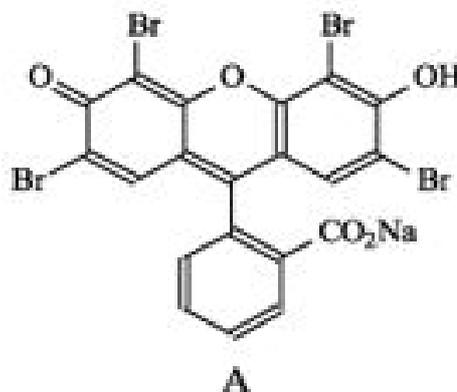


Figura 9 Estrutura química da Eosina Y
Fonte: Perussi (2007, p. 989)

295
 296
 297
 298
 299

300 1.4 Fontes de Luz

301

302 As primeiras fontes de luz utilizadas para TFD eram as lâmpadas convencionais,
 303 que emitem luz branca. Na tentativa de obter variados comprimentos de onda, eram
 304 acoplados filtros coloridos, mas o cálculo da dose era difícil e as características da luz não
 305 eram coerentes para obter o objetivo desejado. Apesar da vantagem de baixo custo, esse

306 tipo de lâmpada apresenta forte componente térmico, o que dificulta sua utilização. Já os
307 lasers transmitem a luz por fibra óptica, apresentam facilidade para o cálculo da dose e
308 apresentam monocromaticidade, que facilita a associação com o corante compatível com o
309 comprimento de onda proposto (YAMADA JR.; HAYEK; RIBEIRO, 2004;
310 BEVILACQUA; BRUGNERA JR.; NICOLAU; 2005).

311 Na Odontologia os lasers mais utilizados apresentam potência entre 1 e 20 watts,
312 como o neodímio, diodo de alta potência, érbio e CO₂. Os lasers de alta potência
313 apresentam a desvantagem de provocar o aumento da temperatura intrapulpar ou no
314 ligamento periodontal, o que pode levar a reabsorções ósseas ou necrose pulpar. Além
315 disso, o custo destes equipamentos é considerado alto. Já os lasers de baixa intensidade
316 possuem menor custo e não provocam aumento de temperatura; quando associados aos
317 corantes favorecem a morte microbiana (YAMADA JR.; HAYEK; RIBEIRO, 2004;
318 BEVILACQUA; BRUGNERA JR.; NICOLAU; 2005).

319 Alguns estudos específicos indicam que certas bactérias orais incluindo *S. mutans* e
320 *S. sobrinus*, podem ser inativadas após TFD com azul de toluidina e azul de metileno
321 (WILSON *et al.*, 1993), alumínio ftalocianina dissulfonada após irradiação com luz laser,
322 ou com o uso de Rose Bengal (PAULINO *et al.*, 2005; PAULINO, 2006)
323 fotossensibilizado por uma luz halógena. Da mesma forma, Cargnelluti (2007) cita
324 diversos estudos científicos que demonstram o sucesso da TFD na eliminação de
325 microrganismos na Odontologia, sugerindo a possibilidade da TFD tornar-se uma terapia
326 alternativa para infecções microbianas localizadas.

327 Justifica-se o presente estudo pela necessidade de obter melhor conhecimento
328 sobre a aplicação da Terapia Fotodinâmica no controle ou inativação do *S. mutans*, uma
329 vez que sua eficácia contribui como mais uma alternativa para o tratamento da cárie.

330

331 **2 HIPÓTESE**

332

333 A hipótese do presente trabalho foi que a associação de corantes (Rose Bengal e
334 Eosina) mais luz (FLH e LED) poderiam inativar *S. mutans* em meio planctônico ou
335 diminuir a atividade metabólica de biofilmes formados por *S. mutans*.

336

337 **3 OBJETIVOS**

338

339 **3.1 Objetivo Geral**

340

341 O objetivo geral do presente trabalho é verificar e determinar a influência da
342 terapia fotodinâmica aplicada “*in vitro*” sobre o microrganismo *Streptococcus mutans*
343 crescendo em meio planctônico e na forma de biofilme.

344

345 **3.2 Objetivos Específicos**

346

- 347 • Avaliar o efeito da TFD aplicada com os corantes Rose Bengal e Eosina na
348 sobrevivência de *S. mutans* crescendo em meio planctônico.
- 349 • Determinar os efeitos de toxicidade no escuro de Rose Bengal e Eosina sobre a
350 sobrevivência de *S. mutans* em meio planctônico e a atividade metabólica de *S.*
351 *mutans* em biofilme;
- 352 • Avaliar o efeito da TFD aplicada com os corantes Rose Bengal e Eosina sobre a
353 atividade metabólica de *S. mutans* crescendo na forma de biofilme;

354

355 **4 METODOLOGIA**

356

357 **4.1 Grupos de estudo**

358

359 Foram utilizados quatro grupos de estudo:

- 360 • 1° - Grupo Controle
- 361 • 2° - Grupo tratado somente com droga
- 362 • 3° - Grupo tratado somente com luz
- 363 • 4° - Grupo TFD (tratado com droga e luz)

364

365 **4.2 *Streptococcus mutans***

366

367 Foi utilizada a linhagem ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*, obtida da
368 Fundação André Toselo, Campinas, São Paulo (www.bdt.fat.org.br). A linhagem foi
369 armazenada à -20°C em glicerol 40 % (v/v).

370

371 **4.3 Manutenção das cepas de *S. mutans***

372

373 As células (400 μL) foram mantidas congeladas a -20°C e também a -80°C , em
374 uma solução de glicerol a 40%.

375

376 **4.4 Meios de cultura**

377

378 **4.4.1 Meio Completo**

379

380 O Meio Completo descrito por Dashper e Reynolds (1991) foi o utilizado. Este
381 meio é composto por 10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 60 $\mu\text{mol/L}$ Fosfato de
382 Magnésio (MgSO_4); 1,3 $\mu\text{mol/L}$ Sulfato de Ferro II (FeSO_4); 1,5 $\mu\text{mol/L}$ Cloreto de
383 Manganês II (MnCl_2); 0,2 mmol/L Fosfato Biácido de Potássio (KH_2PO_4); 0,3 mmol/L
384 Fosfato Monoácido de Potássio (K_2HPO_4); 0,7 mmol/L Cloreto de Potássio (KCl).

385 Soluções estoque (10x concentrada) de cada sal foram preparadas e diluídas no
386 momento do preparo do meio. Em seguida, triptona e extrato de levedura foram
387 adicionados, dissolvidos e o pH foi ajustado para 6,8-7,0.

388

389 **4.4.2 Meio TSB**

390

391 O meio líquido utilizado para repiques e manutenção das cepas de *S. mutans* foi o
392 *Tryptic Soy Broth* (TSB), preparado de acordo com as instruções do fabricante, o qual
393 resulta em 13 mmol/L de glicose, 17 g/L de digesto pancreático de caseína, 3 g/L de
394 digesto papaico de farinha de soja; 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 2,5 g/L de Fosfato
395 Monoácido de Potássio (K_2HPO_4).

396

397 **4.4.3 Meio TSA**

398

399 Foi utilizado o meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), preparado de acordo com as
400 instruções do fabricante, o qual resulta em 15g/L de digesto enzimático de caseína, 5g/L
401 de digesto enzimático de farinha de soja, 5g/L de cloreto de sódio (NaCl) e 15g/L de ágar.

402

403 **4.5 Esterilização dos materiais**

404

405 Todos os materiais e meios de cultura foram autoclavados em autoclave vertical a
406 121°C, e 1Kgf/cm² durante vinte minutos.

407

408 **4.6 Condições de cultivo**

409

410 Uma amostra (200µL) da bactéria congelada foi inoculada em meio TSB (4mL) e
411 incubado em jarra de anaerobiose, durante 24 horas a 37°C em atmosfera microaerófila.
412 Essa atmosfera foi obtida após acender uma vela no interior da jarra para consumir parte
413 do oxigênio disponível.

414 Depois deste inóculo inicial, as células foram submetidas a mais três repiques
415 sucessivos de 12 horas cada um, para o restabelecimento de seu metabolismo normal,
416 estando assim as células disponíveis para utilização nos experimentos ou para ser
417 novamente congeladas para armazenagem em freezer.

418

419 **4.7 Crescimento de *S. mutans* em Meio Planctônico**

420

421 Para crescimento planctônico, a bactéria crescida conforme descrito no item 3.6
422 teve sua absorbância ajustada para 0,2 e um volume de 50 µL foi inoculada em tubos
423 falcon contendo 4 mL TSB previamente autoclavado. Os tubos foram então mantidos em
424 atmosfera microaerofílica (técnica da vela, conforme descrito anteriormente) a 37°C por
425 um período de 12 horas.

426

427 **4.8 Preparação da solução estoque do Agente Fotossensível a ser empregado nos** 428 **experimentos**

429

430 Para os experimentos realizados foi constituída uma solução estoque de Rose
431 Bengal e Eosina com concentração inicial em ambas as drogas de 1×10^{-3} mol/L em tampão
432 fosfato salino (PBS) esterilizado em um filtro de 0,22 μ . Esta solução foi aliquoteada e
433 então armazenada a uma temperatura de -20° C até o uso.

434

435 **4.9 Efeito da Terapia Fotodinâmica após crescimento em Meio Planctônico**

436

437 Para o experimento foi utilizado 1 ml de suspensão bacteriana crescida conforme
438 descrito no item 3.6 e diluída até 10^{-5} . A suspensão bacteriana inicial foi acertada no
439 fotocolorímetro para aproximadamente 0,222 (Densidade Óptica) para posterior diluição.
440 Feito isso, foram utilizados 7 (sete) tubos do tipo Eppendorf aos quais foi adicionado 900 μ L
441 da diluição 10^{-5} em cada um. Um Eppendorf foi utilizado como grupo controle, no qual se
442 colocava apenas a suspensão bacteriana diluída mais 100 μ L de água destilada. Nos outros 6
443 tubos eram adicionados 900 μ L da suspensão bacteriana (10^{-5}) e 100 μ L do corante Rose
444 Bengal ou de Eosina, de modo a obter-se as concentrações indicadas em cada experimento,
445 sendo o tempo de incubação de 5 minutos.

446 Em seguida, um tubo de cada concentração era irradiado durante 60 e 65 segundos
447 de luz proveniente do Fotopolimerizador de Luz Halógena (FLH) e Luz Emitida por Diodo
448 (LED), respectivamente, nos grupos tratados com Rose Bengal e Eosina. Em seguida 50 μ L
449 das suspensões tratadas ou controle foram distribuídos em placas de Petri, contendo TSA
450 devidamente identificadas, (utilizando o método Spread plate). As placas foram colocadas
451 em jarras de anaerobiose utilizando-se a técnica da vela para se obter um ambiente

452 microaerófilo e colocadas em estufa para crescimento e mantidas na temperatura de 37°C,
453 sendo realizada a contagem das UFC's após 48 horas.

454

455 **4.10 Crescimento do Biofilme de *S. mutans* em placa de poliestireno**

456

457 Para a formação do biofilme, a bactéria crescida conforme descrito no item 3.6
458 sendo absorbância ajustada para 0,2 de densidade óptica. Então 750 µL dessa solução foi
459 adicionado, juntamente com 190 µL de sacarose 1%, a 30 mL de meio completo líquido.
460 Após homogeneização foram colocados 600 µL em cada well.

461 As placas foram então cultivadas em atmosfera microaerofílica (técnica da vela,
462 conforme descrito anteriormente) por um período de 12 horas.

463

464 **4.11 Efeito da Terapia fotodinâmica em Biofilme formado por *S. mutans***

465

466 Após o crescimento do biofilme conforme descrito no item 3.10, os wells foram
467 lavados com 600 µL de NaCl 0,9% e tratados com 600 µL de uma solução de corante nas
468 concentrações indicadas em cada experimento. Após incubação de 5 minutos, esse
469 conteúdo foi desprezado e cada well foi irradiado com 60 segundos de Fotopolimerizador
470 de Luz Halógena (FLH) ou 65 segundos de LED (Luz Emitida por Diodo), pelo tempo
471 descrito em cada experimento. Após essa etapa, novamente foi feita a lavagem dos wells
472 com NaCl 0,9% e então acrescentou-se 600 µL de meio completo com sacarose 1%, para
473 determinação da atividade metabólica dos biofilmes.

474

475 **4.12 Fontes de Luz**

476

477 Como fonte de luz foi usado o Fotopolimerizador de Luz Halógena – FLH -
478 (G'natus) com intensidade de luz de 450 mW/cm^2 e comprimento de onda entre 410 e 500
479 nm, além do aparelho de Luz Emitida por Diodo – LED – (SDI - Ralii-Cal) com
480 intensidade de luz de 1200 mW/cm^2 no seu pico máximo e comprimento de onda entre 440
481 e 480 nm.

482

483 **4.13 Análise da atividade metabólica dos biofilmes**

484

485 Para a avaliação da atividade metabólica dos biofilmes, o pH do meio de cultura
486 foi medido após cada tratamento descrito no item 3.11. O pH é medido depois de 2 horas
487 do término do tratamento, com pHmetro digital PG1800 Gehaka, adaptado com
488 Microeletrodo HI7071 e a atividade metabólica foi determinada como sendo a diferença de
489 pH entre o pH do grupo controle e o pH de cada condição testada, sendo denominada ΔpH .

490

491 **4.14. Análise Estatística**

492

493 A análise dos resultados foi feita utilizando software estatístico GraphPad Prism 4
494 for Windows, que serviu também para confecção dos gráficos. A análise estatística
495 mostrou que todos os resultados apresentaram distribuição normal e homogênea (Teste de
496 Bartlett). Assim sendo, foi adotado o teste paramétrico de Comparação Múltipla ANOVA
497 ONE WAY e o teste *pos hoc* Dunnett's para análise de significância, tendo sido
498 empregado Intervalo de Confiança de 95%.

499

500 5 RESULTADOS

501

502 5.1 Espectro de Emissão e Absorção de Luz

503

504 5.1.1 Emissão de Luz pelas fontes empregadas

505

506 A Figura 10 mostra o padrão de emissão de luz pelo LED e o padrão de absorção

507 de luz pelas drogas Eosina e Rose Bengal. Nessa figura observa-se que o LED emite luz

508 em uma pequena faixa do espectro que vai de 400 nm a 550 nm. Mesmo assim, os dois

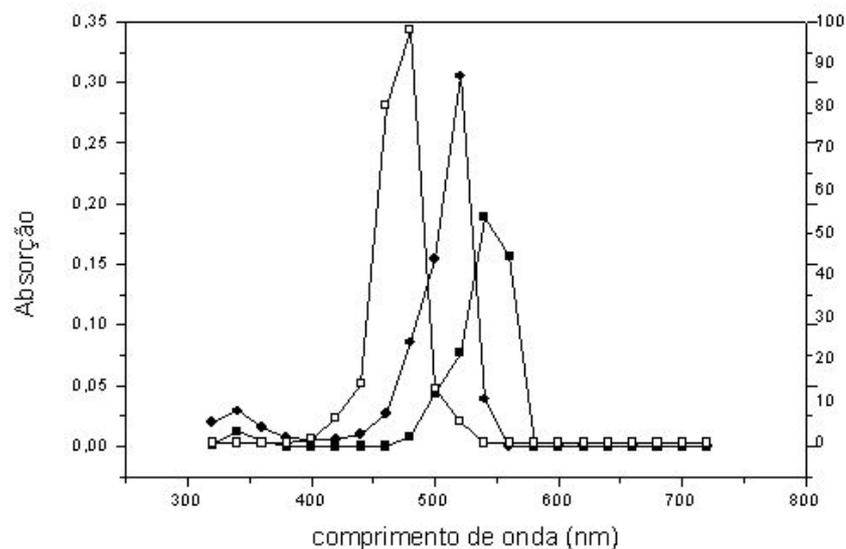
509 corantes absorvem luz na faixa do espectro emitida pelo LED e, apesar de seus espectros

510 de absorção não coincidirem exatamente com o espectro de emissão do aparelho, há uma

511 pequena região de sobreposição das curvas.

512

513



514

515

516 **Figura 10.** Padrão de emissão de luz pelo LED (□) e de absorção de luz pelas drogas

517 Eosina (●) e Rose Bengal (■).

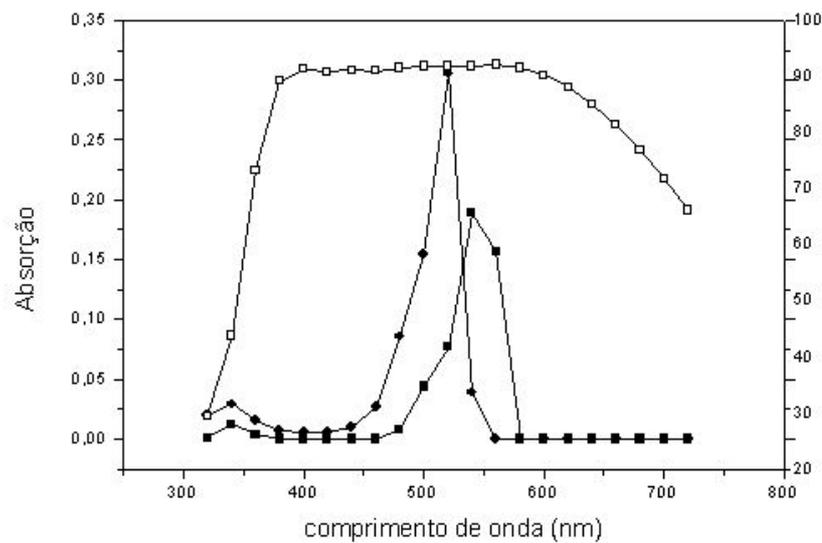
518

519 A Figura 11 mostra o padrão de emissão de luz pelo FLH em comparação com o

520 padrão de absorção de luz pelas drogas Eosina e Rose Bengal. Ao contrário do observado

521 para o LED, o FLH emite luz em um amplo espectro, que vai de 300 nm. a 700 nm. e, com
 522 isso, tanto o Rose Bengal quanto a Eosina são capazes de absorver plenamente a luz
 523 emitida pelo aparelho.

524



525
 526
 527
 528
 529

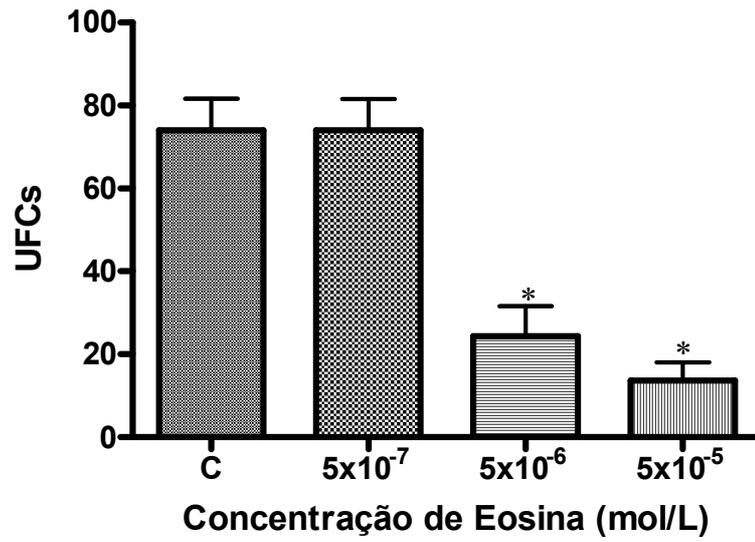
Figura 11. Padrão de emissão de luz pelo aparelho FLH (□) e de absorção de luz pelas drogas Eosina (●) e Rose Bengal (■).

530 5.2 Toxicidade de Eosina e Rose Bengal sobre *S. Mutans* crescendo em Meio 531 Planctônico

532

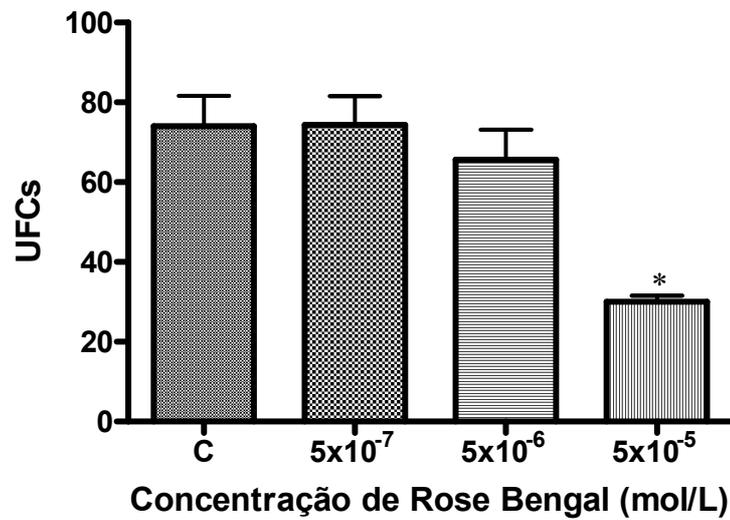
533 A Figura 12 mostra a toxicidade do corante Eosina para culturas planctônicas de *S.*
 534 *mutans*. Observa-se que nas concentrações 5×10^{-6} e 5×10^{-5} mol/L a Eosina causa morte
 535 celular significativa quando comparada com o grupo controle não tratado. Já na
 536 concentração 5×10^{-7} mol/L não ocorre morte celular significativa.

537 Já na Figura 13, demonstra-se que o corante Rose Bengal apresenta menor grau de
 538 toxicidade no escuro para culturas planctônicas de *S. mutans*, uma vez que apenas a
 539 concentração 5×10^{-5} mol/L causa morte celular significativa quando comparada com o grupo
 540 controle não tratado.



541
542
543
544
545
546

Figura 12: Toxicidade da Eosina sobre *S. mutans* crescendo em meio planctônico. (* $p < 0,01$).



547
548
549
550
551

Figura 13: Toxicidade do Rose Bengal sobre *S. mutans* crescendo em meio planctônico. (* $p < 0,01$).

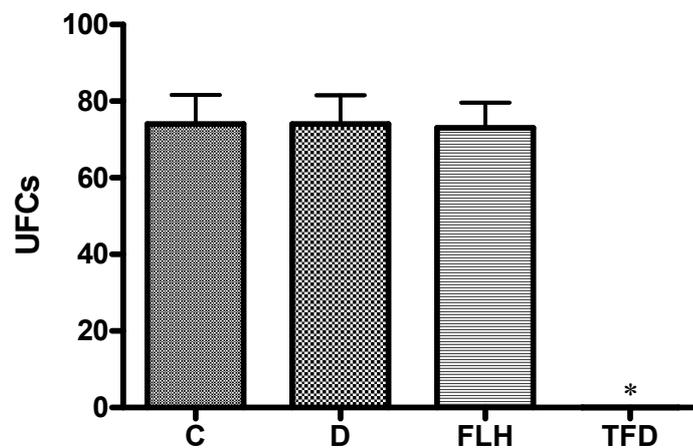
552 5.3 Efeito da TFD com Eosina e Rose Bengal em Meio Plactônico de *S. Mutans*

553

554 Utilizando-se a concentração de 5×10^{-7} mol/L de Eosina e irradiação com FLH por
555 60 segundos, observa-se 100% de morte celular, como mostra a Figura 14. Nessa figura
556 também observa-se que a droga ou a luz aplicadas isoladamente não causaram morte celular
557 significativa em relação ao controle.

558 Na Figura 15 pode se observar que a Eosina na concentração 5×10^{-7} mol/L com a
559 irradiação com LED durante 65 segundos induz 100% de morte celular, sendo que a droga
560 ou a luz, aplicadas isoladamente, não causaram morte celular significativa em relação ao
561 controle.

562



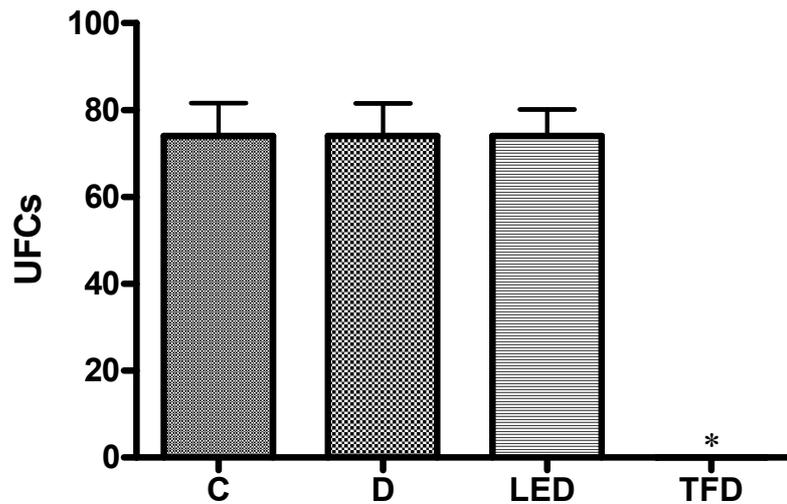
563

564

565 **Figura 14:** Efeito da TFD com Eosina (5×10^{-7} mol/L) e FLH (60 segundos de irradiação)
566 sobre *S. mutans* crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH)
567 = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).

568

569



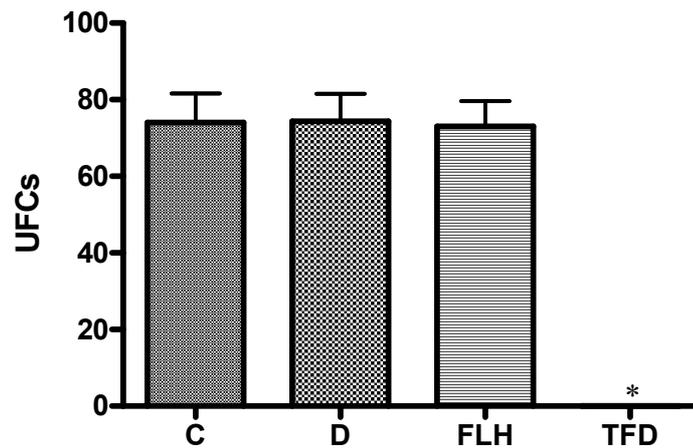
570
571
572
573
574
575

Figura 15: Efeito da TFD com Eosina (5×10^{-7} mol/L) e LED (65 segundos de irradiação) sobre *S. mutans* crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).

576 Na Figura 16 pode se observar que Rose Bengal na concentração 5×10^{-6} mol/L
577 com a irradiação de FLH durante 60 segundos se mostra muito eficaz na inativação das
578 células em suspensão, com 100% de morte celular, sendo que a droga ou a luz aplicadas
579 isoladamente não causaram morte celular significativa em relação ao controle.

580 Na Figura 17 utilizando-se a concentração de 5×10^{-6} mol/L de Rose Bengal e
581 irradiação com LED por 65 segundos, observa-se 100% de morte celular, sendo que também
582 nessa figura observa-se que a droga ou a luz aplicadas isoladamente não causaram morte
583 celular significativa em relação ao controle.

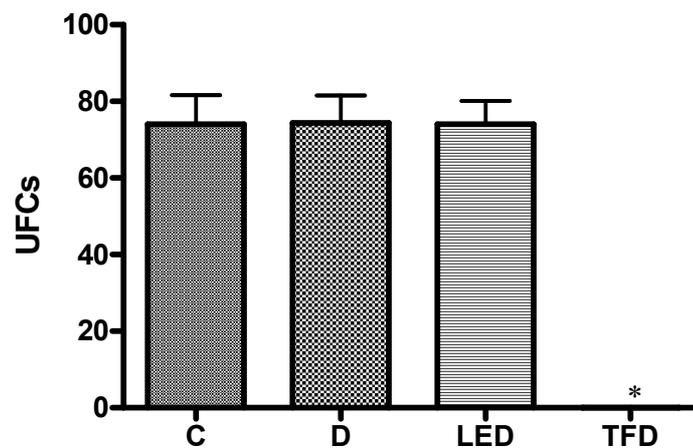
584



585
586
587
588
589
590

Figura 16: Efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e FLH (60 segundos de irradiação) sobre *S. mutans* crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (FLH) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).

591



592
593
594
595
596
597

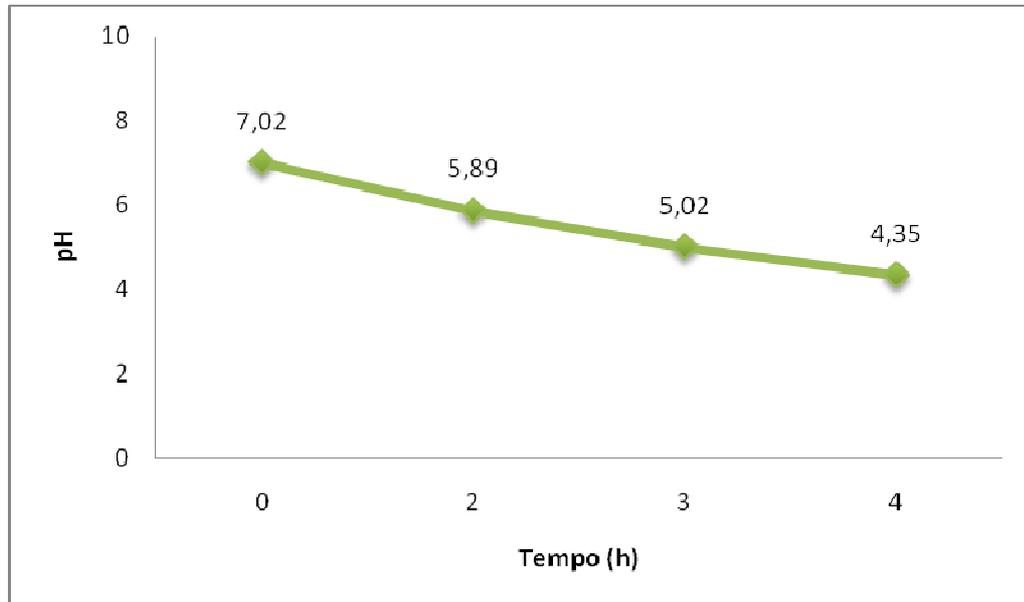
Figura 17: Efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e LED (65 segundos de irradiação) sobre *S. mutans* crescido em meio planctônico. (C) = controle, (D) = apenas a droga, (LED) = apenas a luz, (TFD) = droga + luz. (* $p < 0,01$).

598 5.4 Curva de Acidogenia de *S. Mutans* em Biofilme 599

600 A Figura 18 mostra o padrão de acidificação do meio de cultura pela linhagem
601 ATCC 25175 de *S. mutans*, durante o crescimento em placas de cultura de células. Nas
602 condições empregadas neste estudo, observa-se que o pH decai de maneira mais intensa

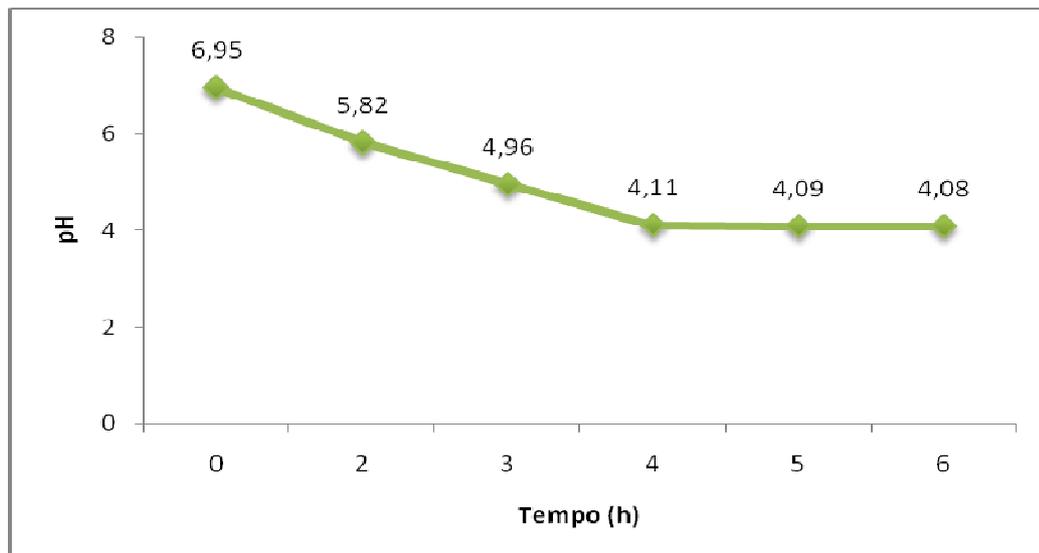
603 nas primeiras horas (até o tempo 4 horas) chegando a 4,35. A Figura 19 mostra que o
604 biofilme formado retém a capacidade acidogênica após remoção do meio de cultura,
605 lavagem do biofilme com solução salina e adição de novo meio de cultura.

606



607
608
609
610
611

Figura 18: Padrão de acidificação do *S. mutans* em placas de cultura contendo meio completo líquido suplementado com sacarose.



612
613
614
615
616

Figura 19: Atividade acidogênica do biofilme após remoção do meio de cultura, lavagem do biofilme e adição de um meio de cultura novo.

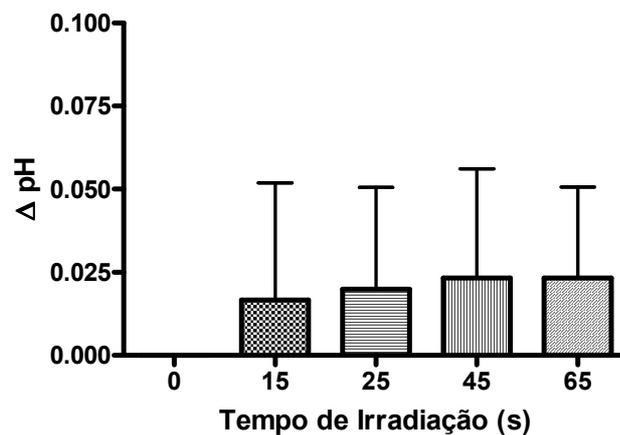
617

618 5.5 Toxicidade de Luz sobre o Biofilme

619

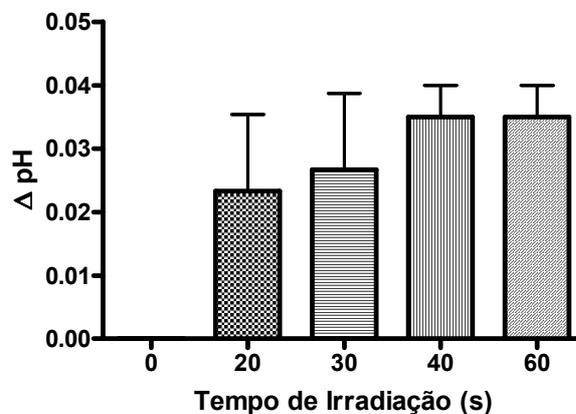
620 O tratamento com luz proveniente do LED, pelos tempos de 15, 25, 45 e 65
 621 segundos ou do FLH de 20, 30, 40 e 60 segundos demonstra que somente a luz não
 622 interfere na capacidade metabólica do biofilme, já que um Δ pH muito pequeno é induzido
 623 por esse tipo de tratamento, como mostram as Figuras 20 e 21. Nessas figuras não se
 624 observa diferença estatística entre os tratamentos com luz e o controle não irradiado
 625 ($p > 0,05$).

626



627
 628
 629
 630
 631

Figura 20: Toxicidade de luz emitida pelo LED sobre o biofilme de *S. mutans*. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle.



632
 633
 634
 635

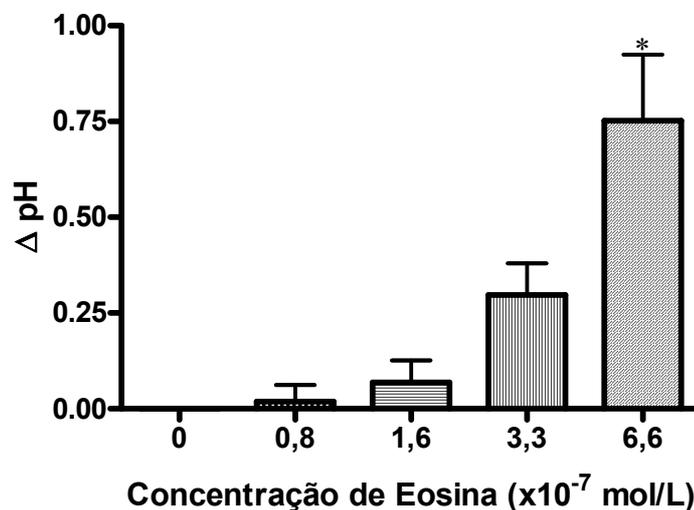
Figura 21: Toxicidade de luz emitida pelo FLH sobre o biofilme. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle.

636 **5.6 Toxicidade das Drogas sobre o Biofilme**

637

638 Na Figura 22 demonstra-se a redução da atividade metabólica dos biofilmes de *S.*
 639 *mutans* quando submetidos a quatro concentrações de Eosina. Observa-se que até a
 640 concentração $3,3 \times 10^{-7}$ mol/L a droga não causou toxicidade significativa, em comparação
 641 ao grupo controle não tratado, mas a concentração de $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L já apresenta
 642 toxicidade significativa ($p < 0,01$).

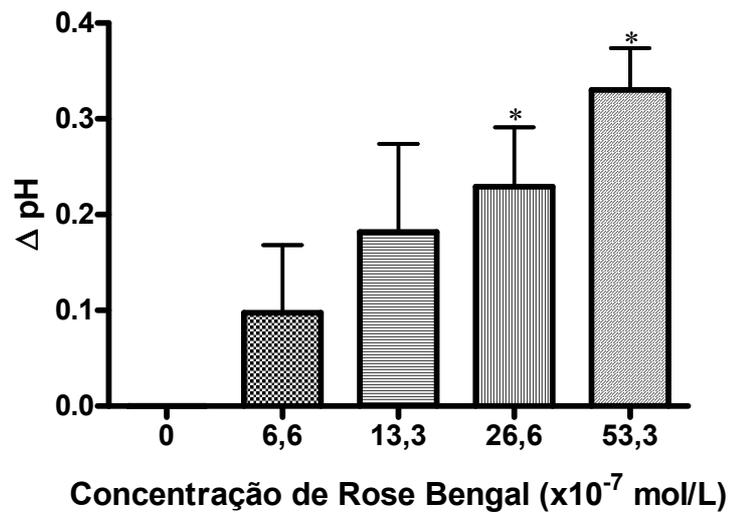
643



644
 645
 646
 647
 648
 649

Figura 22: Atividade metabólica de biofilmes de *S. mutans* tratados com diferentes concentrações de Eosina. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

650 Na Figura 23 demonstra-se a a redução da atividade metabólica de biofilmes de
 651 *S. mutans* submetidos a quatro concentrações de Rose Bengal. Entre as concentrações
 652 empregadas, há maior toxicidade na concentração $53,3 \times 10^{-7}$ mol/L quando comparadas ao
 653 grupo controle ($p < 0,05$). Já as concentrações de $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L e $13,3 \times 10^{-7}$ mol/L não
 654 causaram toxicidade significativa.



655
656
657
658
659
660

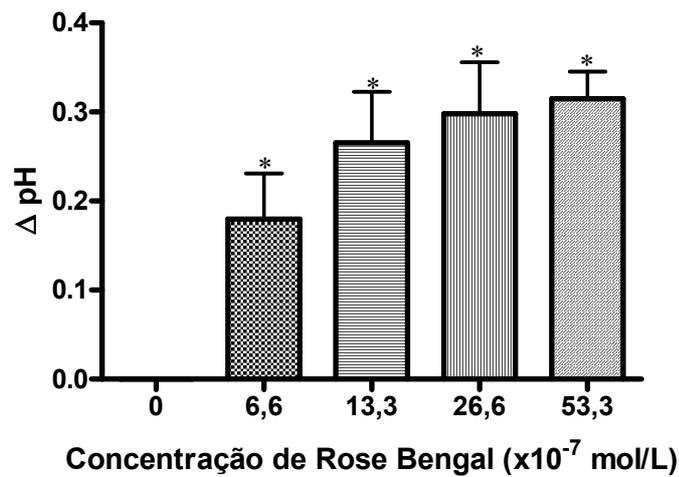
Figura 23. Atividade metabólica de biofilmes de *S. mutans* tratados com diferentes concentrações de Rose Bengal. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).

661

662 5.7 Efeito da TFD com diferentes concentrações de Rose Bengal e Eosina sobre 663 Biofilmes de *S. Mutans*

664

665 A Figura 24 mostra os resultados do tratamento de biofilmes de *S. mutans* com
666 diferentes concentrações de Rose Bengal, seguidas de irradiação de 60 segundos com FLH.
667 Nesta figura pode-se observar que o aumento da concentração do corante leva a uma
668 progressiva diminuição da atividade metabólica, sendo que todos os grupos tiveram valores
669 significativos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

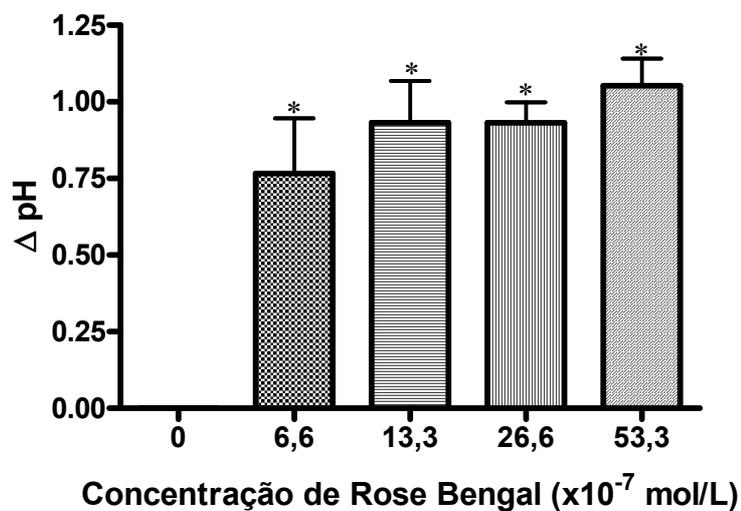


670
671
672
673
674
675

Figura 24: Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Rose Bengal, utilizando 60 segundos de irradiação com FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).

676 A Figura 25 mostra os resultados do tratamento de biofilmes de *S. mutans* com
677 diferentes concentrações de Rose Bengal, seguidas de irradiação de 65 segundos com LED.
678 Nesta Figura pode-se observar que o aumento da concentração do corante leva a uma
679 maior diminuição da atividade metabólica, sendo que todos os grupos apresentaram
680 diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

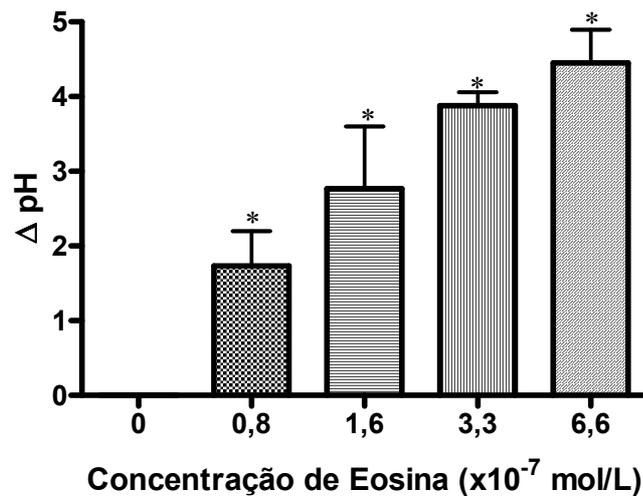
681



682
683
684
685
686

Figura 25: Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Rose Bengal, utilizando 65 segundos de irradiação com LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

687 A Figura 26 mostra os resultados do tratamento de biofilmes de *S. mutans* com
 688 diferentes concentrações de Eosina, seguidas de irradiação de 60 segundos com FLH.
 689 Nesta Figura pode-se observar que o aumento da concentração do corante leva a uma
 690 maior diminuição da atividade metabólica, sendo que todas concentrações tiveram valor
 691 significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).



692
 693
 694
 695
 696
 697

Figura 26: Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Eosina utilizando 60 segundos de irradiação com FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$).

698 A Figura 27 mostra os resultados do tratamento de biofilmes de *S. mutans* com
 699 diferentes concentrações de Eosina, seguidas de irradiação de 65 segundos com LED.
 700 Nesta Figura pode-se observar que o aumento da concentração do corante leva a uma
 701 maior diminuição da atividade metabólica, sendo que todos os grupos tiveram valores
 702 significativos ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

703
 704

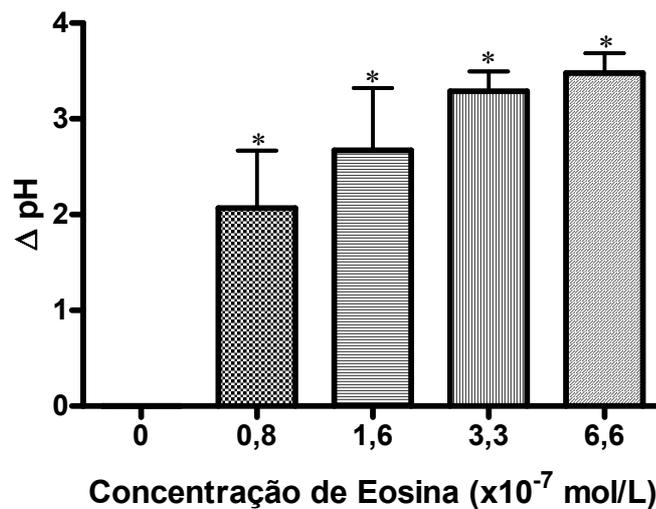


Figura 27: Efeito da TFD sobre biofilmes tratados com Eosina utilizando 65 segundos de irradiação com LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

705
706
707
708
709
710

711

712 5.8 Efeito do Tempo de Irradiação para Biofilmes tratados com Eosina

713

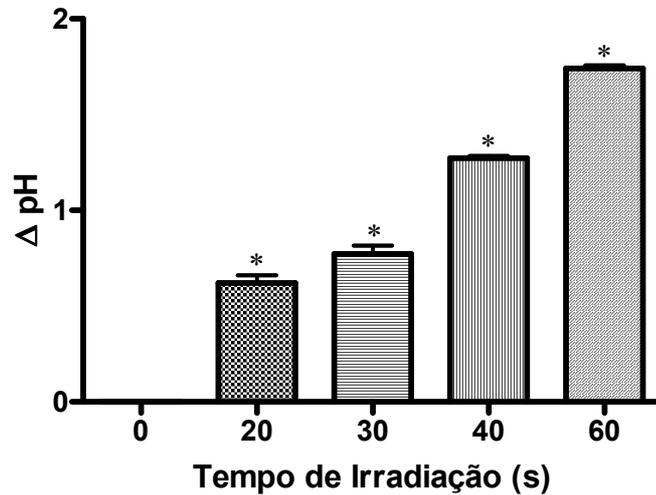
714 Depois de estabelecido uma concentração ideal do corante Eosina ($0,8 \times 10^{-7}$
715 mol/L), novos experimentos foram realizados para se verificar o efeito do tempo de
716 exposição à luz.

717 Na Figura 28 que mostra o efeito da TFD com FLH e Eosina, observou-se uma
718 clara reação dose-resposta. Para irradiação mais curta, um menor efeito redutor da
719 atividade metabólica foi observado (menor Δ pH), enquanto para tempos de irradiação
720 maiores (maior dose de luz) um Δ pH maior foi observado, refletindo menor atividade
721 metabólica dos biofilmes assim tratados.

722 Para a irradiação com LED, um efeito dose-resposta também foi observado,
723 conforme descrito na Figura 29. Esse efeito, no entanto não foi tão intenso quanto para o

724 FLH, embora em todos os tempos de irradiação obtivesse-se diferenças significativas em
725 relação ao grupo controle.

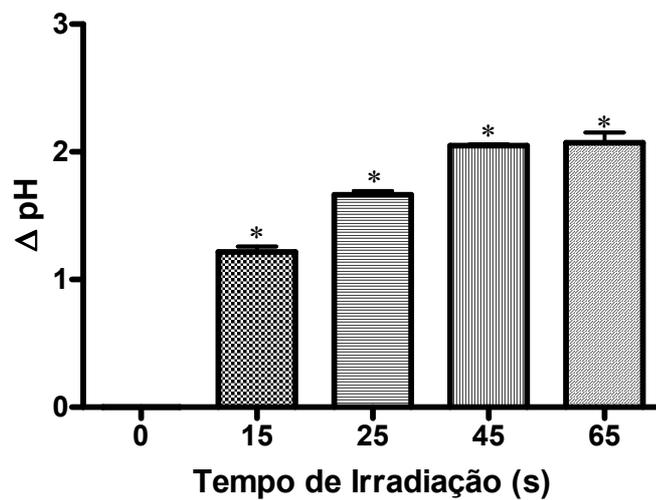
726



727
728
729
730
731

Figura 28: Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina e FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

732



733
734
735
736

Figura 29: Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina e LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

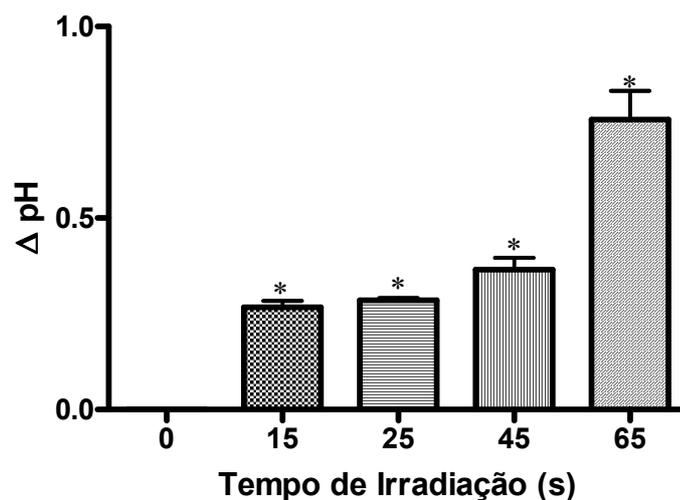
737 **5.9 Efeito do Tempo de Irradiação para Biofilmes tratados com Rose Bengal**

738

739 Depois de estabelecido uma concentração ideal do corante Rose Bengal ($6,6 \times 10^{-7}$
740 mol/L), novos experimentos foram realizados para se verificar o melhor tempo de
741 exposição à luz.

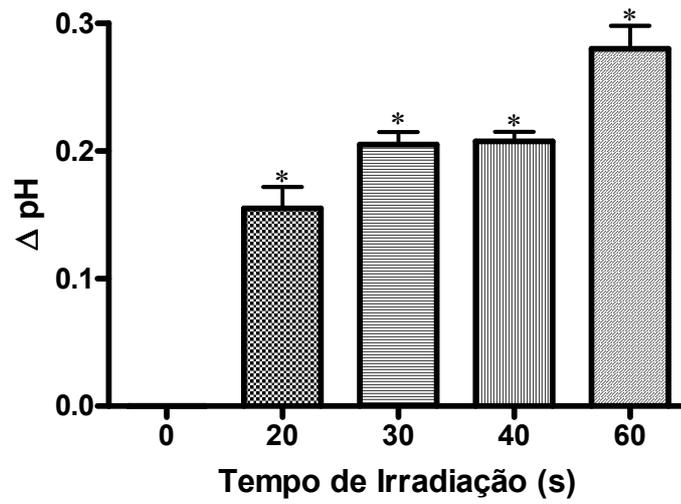
742 A droga Rose Bengal apresentou dados similares aos obtidos para o corante
743 Eosina, com relação ao tempo de exposição à luz, sendo que o LED (Figura 30) tem uma
744 efetividade maior que o FLH (Figura 31) na diminuição da atividade metabólica, com
745 valores significativos em relação ao grupo controle. Observou-se também que, assim como
746 nos testes com Eosina, nos testes com Rose Bengal houve uma clara reação dose-resposta
747 para a irradiação com luz proveniente do FLH e do LED. Para irradiação com tempos de
748 exposição menores, um menor efeito redutor da atividade metabólica foi observado (menor
749 Δ pH), enquanto para tempos de irradiação maiores (maior dose de luz) um Δ pH maior foi
750 observado, refletindo menor atividade metabólica dos biofilmes assim tratados.

751



752
753
754
755
756
757
758

Figura 30: Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal e LED. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).



759
760
761
762
763

Figura 31: Variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal e FLH. Os resultados expressam o Δ pH em relação ao grupo controle. (* $p < 0,01$).

764 6 DISCUSSÃO

765

766 A capacidade de fermentar carboidratos e de reduzir o pH para aproximadamente
767 4-5 são características das bactérias cariogênicas, como *S. mutans*. Da mesma forma, esses
768 microrganismos produzem reservas de polissacarídeos e as utilizam como substrato de
769 fermentação quando não existe carboidrato disponível no meio externo (WILLIANS;
770 ELLIOTT, 1979; MARSH, 2003). Além disso, o *S. mutans* é capaz de produzir enzimas
771 denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose. Os
772 resíduos de glicose unem-se por meio de ligações glicosídicas formando glucanos
773 insolúveis, que conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies. A
774 aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glucanos aderentes e
775 insolúveis e a subsequente formação de ácidos, reduzem o pH da placa bacteriana
776 (LOESCHE, 1986; STAMFORD et al., 2005).

777 A retenção da capacidade acidogênica do *S. mutans* durante o crescimento em
778 placas de cultura foi confirmada pela queda do pH até o tempo de 4 horas e pela
779 manutenção da acidez mesmo após a remoção do meio de cultura, lavagem do biofilme e
780 adição de novo meio de cultura, conforme foi demonstrado. Isso indica que após o
781 crescimento do biofilme até o meio atingir pH ao redor de 4, o biofilme ainda é viável e
782 capaz de metabolizar ativamente o açúcar disponível.

783 No presente estudo foi realizado testes com dois corantes pertencentes ao grupo
784 dos xantenos: a Eosina, um derivado tetrabromo da fluoresceína que pode ser usado para
785 corar o citoplasma, o colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio e para
786 finalidades específicas na Terapia Fotodinâmica e o Rose Bengal, um haleto derivado da
787 fluoresceína utilizado como um agente fotossensibilizador capaz de eliminar vírus,
788 bactérias e protozoários.

789 Diversos autores descrevem o uso de Rose Bengal como sendo efetivo para
790 inativar bactérias orais em meio planctônico e biofilme na TFD (WILSON *et al.*, 1993;
791 PAULINO *et al.*, 2005; PAULINO, 2006; CARGNELLUTI, 2007). Já a Eosina foi usada
792 em 1903 por Trappeiner como corante de uso tópico e posterior exposição à luz, para
793 tratamento de câncer de pele. A partir dessa data, foram realizadas diversas pesquisas para
794 determinar a ação da TFD em tumores, no entanto poucas pesquisas foram feitas com o uso
795 da Eosina na TFD (SMITH, 1984; CARGNELLUTI, 2007).

796 O corante Rose Bengal, isoladamente, em meio planctônico, não mostrou
797 toxicidade significativa nas concentrações finais 5×10^{-6} e 5×10^{-7} mol/L, mas na
798 concentração 5×10^{-5} mol/L a diferença significativa em relação ao controle ocorreu.
799 Paulino (2006) demonstrou que Rose Bengal em concentração abaixo de $5,0 \mu\text{mol/L}$ ou
800 5×10^{-6} mol/L não apresentou toxicidade para uma suspensão de *S. mutans*. Dessa forma, os
801 dados do presente trabalho estão de acordo aos apresentados por Paulino (2006). O corante
802 Rose Bengal é descrito como um bom gerador de ERO's (PAULINO *et al.*, 2005), mas seu
803 uso clínico tem sido restringido devido a seu suposto grau de toxicidade no escuro. Paulino
804 em 2006 demonstra que o Rose Bengal na concentrações abaixo de 5×10^{-6} mol/L são
805 inertes á viabilidade celular para cultura de fibroblastos, sendo que no nosso estudo foi
806 demonstrado que para suspensão de células de *S. mutans* a concentração efetiva para TFD
807 é mesma.

808 Já a Eosina demonstrou toxicidade somente na concentração de de 5×10^{-5} mol/L e
809 5×10^{-6} mol/L, não apresentando toxicidade na concentração 5×10^{-7} mol/L, concentração
810 que foi empregada nos testes de TFD.

811 Na TFD, o corante ou a luz, quando usados em doses terapêuticas e
812 separadamente, não devem apresentar citotoxicidade (JARRATT *et al.*, 1982). No presente
813 trabalho demonstrou-se que, isoladamente, a incidência de luz de LED (doses de 15, 25, 45

814 e 65 segundos) ou do FLH (doses de 20, 30, 40 e 60 segundos) e das drogas nas
815 concentrações ideais, não interfere na capacidade metabólica do biofilme de *S. mutans* e na
816 sobrevivência dos mesmos em meio planctônico. A efetividade da luz sobre a viabilidade
817 celular depende da sua ação sobre o agente fotossensível juntamente com o oxigênio, e não
818 tem ação quando sozinha (GARCEZ, 2002; YAMADA JR.; HAYEK; RIBEIRO, 2004).

819 O processo da TFD que leva a morte celular é explicado pelo fato de que o
820 oxigênio singleto reage com quase todos os componentes celulares, uma vez que os
821 compostos orgânicos insaturados são de uma forma geral, suscetíveis à ação de $^1\text{O}_2$. A
822 primeira barreira para o $^1\text{O}_2$ é a membrana celular e esta contém lipídeos insaturados que
823 podem ser danificados, ocorrendo a inviabilidade celular. Os hidroperóxidos resultantes
824 podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) através de reações
825 catalíticas. Uma vez que a reatividade das ERO's com moléculas orgânicas não é
826 específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para
827 TFD. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem
828 resistência celular, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte
829 celular (CARRÉ et al., 1999).

830 A eficácia do mecanismo fotodinâmico de Rose Bengal em um ambiente aquoso
831 contendo nucleotídeos, sob irradiação em 532 nm é descrita por Perussi como
832 predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singleto e os restantes 20% de
833 ânion superóxido. De acordo com esse autor, o composto exibe uma potente atividade
834 fototóxica antitumor *in vitro* e *in vivo* (PERUSSI, 2007). Nos nossos resultados com
835 suspensão de células, observamos que o corante Rose Bengal apresenta uma menor
836 toxicidade no escuro que o corante Eosina (5×10^{-6} e 5×10^{-7} mol/L, respectivamente) mas,
837 na aplicação da TFD o corante Eosina mostrou-se mais eficaz tendo em vista que com a

838 concentração 5×10^{-7} mol/L houve a mesma porcentagem de morte celular que a obtida com
839 Rose Bengal a 5×10^{-6} mol/L, conforme observado nas Figuras 14 a 17.

840 A localização do corante na célula alvo tem sido motivo de dúvidas, em
841 decorrência do baixo alcance e da vida curta dos intermediários reativos gerados durante a
842 excitação da droga pela luz. Alguns autores sugerem que a penetração em células seria
843 essencial para a ação fotodinâmica de alguns corantes, enquanto que para outros, a ação
844 fotodinâmica tem sido observada sem penetração do corante na célula alvo (DAHL;
845 MIDDEN; NECKERS, 1988).

846 Paulino (2006), utilizando os corantes Rose Bengal (0,5 $\mu\text{mol/L}$) e FLH como
847 fonte de luz, demonstrou que os compostos produzidos na TFD são os responsáveis pela
848 morte bacteriana em meio planctônico, sendo que a incubação prévia com agentes
849 fotossensíveis pode ser desconsiderada, uma vez que as células irradiadas após a adição de
850 corantes foram inativadas após a TFD. Em relação a biofilme, Paulino (2006) observou
851 que é possível promover uma diminuição da formação de biofilme por *S. mutans*, com a
852 TFD, sendo que a incubação prévia com agentes fotossensíveis pode ser desconsiderada,
853 uma vez que as células irradiadas após a adição de corantes foram inativadas após a TFD.

854 No presente estudo, percebemos que em meio Planctônico, onde as células estão
855 em suspensão e desagrupadas, a eficiência da TFD na mortalidade celular foi total,
856 enquanto que no biofilme, sendo este uma forma de organização mais complexa, melhor
857 organizada e dessa forma mais protegido (WAINWRIGHT, 2002), a eficiência da TFD é
858 menor. Como demonstrado nos nossos resultados, o tratamento com TFD não causa morte
859 e nem mesmo inativa totalmente a capacidade acidogênica de biofilmes de *S. mutans*,
860 confirmando que essa forma de crescimento realmente protege as células contra agentes
861 potencialmente lesivos. Observamos, da mesma forma, outros autores (PAULINO et al.,
862 2005; PAULINO, 2006; PERUSSI, 2007), que quando aplicada à células em suspensão, a

863 TDF com Rose Bengal causa 100% de morte celular. Já nossos resultados da aplicação da
864 TFD em biofilmes sugerem que, em concentrações não tóxicas, esta modalidade
865 terapêutica é incapaz de causar morte celular, haja visto que em nenhuma situação testada
866 foi obtido o efeito inibidor total da atividade metabólica.

867 Segundo estudos feito por Zanin et al em 2003 a atuação da TFD produziu efeito
868 bactericida total em *S. mutans* em meio planctônico, caindo de 10^7 a 10^{10} UFCs /ml para
869 zero. Já em 2005, Zanin et al, estudando o efeito da TFD sobre biofilmes de *S. mutans*,
870 demonstraram reduções significativas da viabilidade celular após a TFD tanto com
871 utilização do laser de HeNe como pela luz LED. No entanto, esses autores descrevem que
872 este efeito se limitou as camadas externas dos biofilmes, o que confirma a maior
873 dificuldade de penetração da droga em um meio melhor organizado. Nossos resultados
874 confirmam esse achado, tendo em vista que apesar das camadas superficiais dos biofilmes
875 poderem ter sido danificadas pela TFD, as camadas mais profundas podem responder pela
876 acidogenia observada, como mostrado nas Figuras 24, 25, 26, 27.

877 No presente estudo, o tempo de irradiação da luz do FLH e de LED foi testado
878 com sucesso em biofilmes tratados com os corantes Rose Bengal e Eosina. Verificou-se
879 maior efetividade quando a TFD é realizada com maiores doses de luz, favorecendo a
880 diminuição da atividade metabólica do *S. mutans*. Isso se nota especialmente quando a
881 fonte de luz é o LED, talvez pelo fato de possuir uma maior intensidade de luz que o FLH.
882 Quando comparamos o Δ pH obtido usando 25 segundos de LED com 60 segundos de
883 FLH, observa-se valores similares, independentemente do corante empregado, sugerindo
884 que o determinante da eficácia da TFD não é a fonte de luz, mas sim a potência aplicada.

885 O efeito da incidência de luz (FLH 60 segundos e LED 65 segundos) sobre
886 biofilmes de *S. mutans* tratados com diferentes concentrações de Rose Bengal e Eosina
887 levou à diminuição da atividade metabólica, de acordo com o aumento da concentração do

888 corante, com valores significantes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Wood et al em
889 2006, comparando a eficácia dos corantes Eritrosina, Azul de Metileno e Photofrin[®] na
890 TFD com luz branca (500-650 nm) contra biofilmes de *S. mutans*, observou que a
891 Eritrosina foi mais eficiente do que os outros dois corantes usados. Esses autores
892 observaram que, na concentração 22×10^{-6} mol/L houve mais de 99% de morte celular após
893 a TFD com Eritrosina. Esses dados diferem dos obtidos no presente trabalho, tendo em
894 vista que nós utilizamos uma concentração aproximadamente 30 vezes menor que a desses
895 autores. Observe-se que na concentração de eosina, cuja estrutura molecular é muito
896 similar à da eritrosina., $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L já observamos toxicidade no escuro e, dessa forma,
897 podemos supor que na concentração 22×10^{-6} mol/L a morte induzida pelo corante “*per se*”
898 e não por ação da TFD deveria ser substancialmente maior.

899 A ação da TFD nas infecções orais em modelo experimental em animais tem sido
900 pesquisada, sendo observado que esta modalidade terapêutica acarreta redução de
901 patógenos do biofilme dental e peri-implantar concluindo-se, portanto, que a TFD é um
902 tratamento não invasivo que pode ser utilizado como aliado ao tratamento odontológico
903 convencional. O procedimento pode ser repetido diversas vezes, já que não há efeitos
904 tóxicos cumulativos e usualmente é não invasivo. Além disso, devido ao seu baixo risco,
905 pode ser usado em pessoas idosas ou que estão muito debilitadas para se submeterem a um
906 procedimento cirúrgico. O principal efeito colateral é a sensibilização à luz, o que é
907 contornado evitando exposição à luz solar e luz interna intensa por um período de até 6
908 semanas, dependendo do fotossensibilizador utilizado no processo (CAPELLA, 2003;
909 CARGNELLUTI, 2007).

910 Com base nos diversos estudos realizados sobre o assunto, observa-se que a
911 Terapia Fotodinâmica pode ser utilizada como uma técnica alternativa e coadjuvante no
912 tratamento odontológico, especialmente para inativar microorganismos patogênicos. Este

913 tratamento não causa resistência bacteriana, pode ser aplicado no local, sem a utilização de
914 procedimentos invasivos, baseando-se na associação de um corante e de luz para promoção
915 de morte bacteriana, na presença de um meio rico em oxigênio (PRATES, 2005).

916

917 7 CONCLUSÕES

918

919 Os resultados apresentados no presente trabalho nos permitem concluir:

- 920 • A TFD aplicada a uma suspensão de *S. mutans* causou 100% de morte celular
921 com ambos os corantes e ambas as fontes de luz. Para essa modalidade de
922 crescimento o melhor corante foi a Eosina.
- 923 • Para *S. mutans* o corante Eosina apresenta maior toxicidade no escuro do que o
924 corante Rose Bengal, tanto para crescimento planctônico quanto para biofilmes,
925 embora nesta condição a diferença entre a concentração tolerável de cada corante
926 seja menor que a observada para suspensão de células.
- 927 • A TFD aplicada a biofilmes reduziu sua capacidade metabólica, refletido pela
928 menor acidogenia. Para essa modalidade de crescimento a melhor combinação foi
929 a que empregou o corante Eosina com a fonte de luz LED.

930

931 **8 REFERÊNCIAS**

932

933

934 ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The History of Photodetection and
935 Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

936

937

938 BARBIERI, D. de S. V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e**
939 ***Candida albicans* na superfície dentária.** Dissertação [Mestrado em Microbiologia].
940 Universidade Federal do Paraná, 2005. 124 p.

941

942

943 BEVILACQUA, I. M.; BRUGNERA JR., A.; NICOLAU, R. A. **Ação do laser de baixa**
944 **potência associado à substâncias fotoativadoras na redução microbiana.**In: IX
945 Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de
946 Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2005. p. 1925-1927.

947

948

949 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção
950 Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil: Condições de Saúde**
951 **Bucal da População Brasileira.** Brasília, 2004.

952

953

954 BENGTON, C. R. G. **Estudo in vitro da influência da contaminação com**
955 ***Streptococcus mutans* e da descontaminação com Digluconato de Clorexidina 2% na**
956 **resistência da união de sistemas adesivos à dentina humana.** Dissertação [Mestrado em
957 Dentística]. Faculdade de Odontologia de São Paulo. USP. São Paulo, 2007. 99p.

958

959

960 BUISCHI, Y. P. **Promoção de Saúde Bucal na Clínica Odontológica.** São Paulo: Artes
961 Médicas EAP - APCD, 2000. 359p.

962

963

964 CALVETE, M. J. F.; GOMES, A. T. P. C.; MOURA, N. M. M. Clorinas em Terapia
965 Fotodinâmica. Síntese e Aplicações. **Rev. Virtual Quím.**, v. 1, n. 2 (no prelo), abr./jun.,
966 2009. Disponível em:<<http://www.uff.br/rvq>>. Acesso em 08 abr 2009.

967

968

969 CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S. A Light in Multidrug Resistance: Photodynamic
970 Treatment of Multidrug-Resistant Tumors. **J. Biomed**, v. 10, p. 361-366, 2003.

971

972

973 CARGNELLUTI, T. **Estudo comparativo da influência da Terapia Fotodinâmica**
974 **antimicrobiana e remoção mecânica de biofilme no processo inflamatório periodontal**
975 **induzido em hamsters.** Dissertação [Mestrado Profissional de Lasers em Odontologia].
976 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2007. 54 p.

977

978

- 979 CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.;
980 GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M.; J. **Photochem. Photobiol.**, v. 48, n. 57,
981 1999.
982
983
984 CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the a etiology of dental caries. **Br J Exp Pathol** ,
985 v. 5, p. 141-147, 1924.
986
987
988 COSTA, D. L. L.B; BERNAL, C.; PERUSSI, J. R. Estudo da eficiência fotodinâmica de
989 corantes xantenos com aplicação em inativação de microorganismos. 30^a Reunião Anual
990 da Sociedade Brasileira de Química. **Quím. Nova**, v.30, n. 4, São Paulo, Jul/Aug.2007.
991
992
993 DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; NECKERS, D. C. Comparison of photodynamic action by
994 rose Bengal in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Photochem. Photobiol.**, v. 48,
995 p. 607-612, 1988.
996
997
998 DALE, S. E.; SEBULSKY, M. T.; HEINRICHS, D. E. Involvement of Sir ABC in iron-
999 siderophore import in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v. 186, p. 8356-8362, 2004.
1000
1001
1002 DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J Can Dent**
1003 **Assoc.**, v. 69, p. 722-724, 2003.
1004
1005
1006 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell
1007 density on microbial photoinactivation. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 2329-
1008 2335, 2005.
1009
1010
1011 FERREZ, M.; HAFFAJEE, A.D.; GONCALVES C.; ALLARD, K.A.; SOM, S.; SMOTH,
1012 C.; GOODSON, J.M.; SOCRANSKY, S.S. Systemic doxycycline administration in the
1013 treatment of periodontal infections. **J. Clin. Periodont.**, v. 26, p.784-792, 1999.
1014
1015
1016 GARCEZ, A. S. **Laser em baixa intensidade associado à fotossensibilizador para**
1017 **redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico.** 2002. Dissertação
1018 [Mestrado Profissionalizante em Lasers em Odontologia]. Instituto de Pesquisas
1019 Energéticas e Nucleares, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2002.
1020 91 p.
1021
1022
1023 GOMER, C. J.; RUCKER, N.; FERRARIO, A.; WONG, S. Properties and applications of
1024 photodynamic therapy. **Rad. Res.**, v. 120, n. 1, p. 1-18, 1989.
1025
1026

- 1027 HARRINGTON, D. J.; RUSSELL, R. R. Identification and characterisation of two
1028 extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p.
1029 237-241, 1994.
1030
1031
- 1032 HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; QVIST, K. B. Direct observation of bacterial
1033 exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. **J Dairy**
1034 **Sci.**, v. 85, p. 1705-1708, 2002.
1035
1036
- 1037 HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work?
1038 **Photochem. Photobiol.**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.
1039
1040
- 1041 HOMER, K. A.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci.
1042 **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 257-260, 1990.
1043
1044
- 1045 JACKSON, R. J.; LIM, D. V.; DAO, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic
1046 activity in *Streptococcus mutans*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 49-54, 1997.
1047
1048
- 1049 JARRAT, M.; HUBLER, W.; PANEK, W. Dye-Light Phototherapy of viral, bacterial, and
1050 fungal infections. In: The Science of Photomedicine. Regan J. D. and Parrish J. A. **Plenum**
1051 **Press**, p. 561, New York, 1982.
1052
1053
- 1054 JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*
1055 236(2): p.163-73, 2004.
1056
1057
- 1058 KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch.**
1059 **Oral Biol.**, Oxford, v. 1, p. 304-320, 1960.
1060
1061
- 1062 KOLENBRANDER, P.E. **Oral microbial communities: biofilms, interactions, and gene**
1063 **systems**. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 54, p. 413-437, 2000.
1064
1065
- 1066 KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **J. Dent. Res.**, v.
1067 86, n. 8, p. 694-707, 2007.
1068
1069
- 1070 LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; MARLE, J. V. Antimicrob. Agents
1071 **Chemother.**, v. 49, p. 2026, 2005.
1072
1073
- 1074 LEITÃO, D. P. S.; FONSECA, M. J. V.; POLIZELLO, A. C. M.; SPADARO, A. C. C.
1075 Evaluation of the influence of cetylamine fluoride and sodium fluoride on acid production
1076 by *S. mutans*. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 37, p. 364-372, 2001.

- 1077 LIMA, J. E. Cárie dentária: um novo conceito. **R. Dental Press Ortodon Ortop Facial**,
1078 Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov./dez. 2007.
1079
1080
- 1081 LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological**
1082 **Reviews**, v.50, p.353-380, 1986.
1083
1084
- 1085 MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative
1086 bacteria: problems and possible solutions. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 14, n. 3, p.262-
1087 266, 1992.
1088
1089
- 1090 MALTZ, M.; CARVALHO, J. **Diagnóstico da doença cárie**. ABOPREV. Promoção de
1091 Saúde Bucal, São Paulo: Artes Médicas, 1997, p.69-92.
1092
1093
- 1094 MARSH, P. D.; BRANDSHAW, D. J. The effect of fluoride on the stability of oral
1095 bacterial communities in vitro. **J Dent Res.**, v. 69, p. 668-671, 1990.
1096
1097
- 1098 MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.
1099 149, p. 279-294, 2003.
1100
1101
- 1102 OLSVIK, B.; TENOVER, F. C. Tetracycline resistance in periodontal pathogens. **Clin.**
1103 **Infec. Diseases**, v. 16, p.310-313, 1993.
1104
1105
- 1106 PAULINO, T. P. **Ação dos corantes fotossensíveis em meio homogêneo e micro**
1107 **heterogêneo de lipossomos no controle do crescimento de *Streptococcus mutans***. Tese
1108 [Doutorado em Ciências; Área de Química]. Universidade de São Paulo. Faculdade de
1109 Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Departamento de Química. Ribeirão Preto,
1110 2006. 114 p.
1111
1112
- 1113 PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI, G. Jr.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI,
1114 P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch.**
1115 **Oral Biol.**, v. 50, p. 353-359, 2005.
1116
1117
- 1118 PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de Microorganismos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4,
1119 2007.
1120
1121
- 1122 PRATES, R. A. **Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica:**
1123 **Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo in-vitro**.
1124 Tese [Mestrado Profissional em Laser em Odontologia]. IPEN. Instituto de Pesquisas
1125 Energéticas Nucleares. São Paulo, 2005. 49 p.
1126

- 1127 RODRIGUES, C. R. M. D.; FERNANDES, F. R. C.; GUEDES-PINTO, A. C. Cárie
1128 dentária. In: GUEDES-PINTO, A. C. **Odontopediatria**. São Paulo: Santos; 2003. p. 291-
1129 322.
- 1130
1131
- 1132 SANTOS, A. P. P.; SOVIERO, V. M. Caries prevalence and risk factors among children
1133 aged 0 to 36 months. **Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 203-208, jul./set. 2002.
1134
1135
- 1136 SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic
1137 principles and clinical applications. **Drug Discov. Today**, v. 4, n. 11, nov. 1999.
1138
- 1139 SMITH, D. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**,
1140 v. 13, n.4, p. 335-349, 2002.
1141
1142
- 1143 STAMFORD, T. C. M.; PEREIRA, D. M. de S.; ALCÂNTARA, L. C. de; COUTO, G. B.
1144 L. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie
1145 em adolescentes sadios. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, Recife, v. 5, n. 1, p. 71-76,
1146 jan. / mar., 2005.
1147
1148
- 1149 TENUTA, L. M. A.; LIMA, J. E. O.; CARDOSO, C. L.; CURY, J. A. Effect to plaque
1150 accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in
1151 situ. **Pesq Odontol Bras.**, v. 17, p. 326-331, 2003.
1152
1153
- 1154 TOMÉ, F. M. **Síntese e análise espectrofotométrica de naftalocianinas com aplicação**
1155 **na terapia fotodinâmica**. São José dos Campos. 2002. [Dissertação de Mestrado],
1156 Universidade do Vale do Paraíba. 88 p.
1157
1158
- 1159 ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA JR., A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R. B. Terapia
1160 Fotodinâmica na Odontologia (TFD). **R. G. O.**, v. 51, n. 3, p. 179-182, jl./ago./set., 2003.
1161
1162
- 1163 ZANIN, I. C. J.; GONÇALVES, R. B.; BRUGNERA JR., A.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J.
1164 Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilmes to photodynamic therapy: an in vitro
1165 study. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 56, p. 324-330, 2005.
1166
1167
- 1168 WILLIAMS, R. A. D.; ELLIOTT, J. C. Basic and applied dental biochemistry.
1169 **Edinburgh: Churchill Livingstone**, 1979, p. 180.
1170
1171
- 1172 WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria
1173 to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 8, p. 182-187,
1174 1993.
1175
1176

- 1177 WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential
1178 photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **Journal of**
1179 **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 680-684, 2006.
1180
1181
1182 WUNDER, D.; BOWEN, W. H. Action of agents on glucosyltransferases from
1183 *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. **Arch Oral Biol.**,
1184 v. 44, p. 203-214, 1999.
1185
1186
1187 YAMADA JR., A. M.; HAYEK, R. R. A.; RIBEIRO, M. S. O emprego da Terapia
1188 Fotodinâmica (PDT) na redução bacteriana em Periodontia e Implantologia. **RGO**, v; 52,
1189 n.3, p. 207-210, jul./ago./set., 2004.
1190

1191 APÊNDICES

1192

1193

1194 **1. Dados referentes à toxicidade da Eosina (C= mol/L) sobre *S. mutans* crescendo em**
 1195 **meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1196

1197

Controle	5×10^{-7}	5×10^{-6}	5×10^{-5}
59	59	36	22
83	84	26	12
80	79	11	7

1198

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
C vs 5×10^{-7}	0	0	P > 0.05	-27.89 to 27.89
C vs 5×10^{-6}	49,67	5,129	P < 0.01	21.78 to 77.56
C vs 5×10^{-5}	60,33	6,23	P < 0.01	32.44 to 88.22

1199

1200

1201

1202 **2. Dados referentes à toxicidade do Rose Bengal (C= mol/L) sobre *S. mutans***
 1203 **crescendo em meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1204

1205

Controle	5×10^{-7}	5×10^{-6}	5×10^{-5}
59	60	55	33
84	83	80	28
79	80	62	29

1206

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
C vs 5×10^{-7}	-0,3333	0,03635	P > 0.05	-26.75 to 26.08
C vs 5×10^{-6}	8,333	0,9086	P > 0.05	-18.08 to 34.75
C vs 5×10^{-5}	44	4,798	P < 0.01	17.59 to 70.41

1207

1208

1209

1210 **3. Dados referentes ao efeito da TFD com Eosina (5×10^{-7} mol/L) e FLH (60s) sobre *S.***
 1211 ***mutans* crescendo em meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1212

1213

Controle	Droga	FLH	TFD
59	59	60	0
84	83	82	0
79	80	77	0

1214

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
C vs D	0	0	P > 0.05	-25.73 to 25.73
C vs FLH	1	0,1119	P > 0.05	-24.73 to 26.73
C vs TFD	74	8,282	P < 0.01	48.27 to 99.73

1215

1216

1217

1218 **4. Dados referentes ao efeito da TFD com Eosina (5×10^{-7} mol/L) e LED (65s) sobre *S.***
 1219 ***mutans* crescendo em meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1220
 1221

Controle	Droga	LED	TFD
59	59	62	0
84	83	82	0
79	80	78	0

1222

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	P value	IC 95%
C vs D	0	0	P > 0.05	-25.16 to 25.16
C vs LED	0	0	P > 0.05	-25.16 to 25.16
C vs TFD	74	8,47	P < 0.01	48.84 to 99.16

1223
 1224
 1225

1226 **5. Dados referentes ao efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e FLH (60s)**
 1227 **sobre *S. mutans* crescendo em meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1228
 1229

Controle	Droga	FLH	TFD
59	60	60	0
84	83	82	0
79	80	77	0

1230

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
C vs D	-0,3333	0,03789	P > 0.05	-25.67 to 25.00
C vs FLH	1	0,1137	P > 0.05	-24.34 to 26.34
C vs TFD	74	8,412	P < 0.01	48.66 to 99.34

1231
 1232
 1233

1234 **6. Dados referentes ao efeito da TFD com Rose Bengal (5×10^{-6} mol/L) e LED (65s)**
 1235 **sobre *S. mutans* crescendo em meio planctônico. Contagem de UFC's.**

1236
 1237

Controle	Droga	LED	TFD
59	60	62	0
84	83	82	0
79	80	78	0

1238

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
C vs D	-0,3333	0,03878	P > 0.05	-25.09 to 24.42
C vs LED	0	0	P > 0.05	-24.76 to 24.76
C vs TFD	74	8,609	P < 0.01	49.24 to 98.76

1239
 1240
 1241
 1242
 1243
 1244

1245 **7. Dados referentes à toxicidade de luz emitida pelo LED sobre biofilme de *S. mutans*.**

1246

1247

Tempo (s)				
0	15	25	45	65
Δ pH				
0	0,07	0,06	0,07	0,06
0	0,03	0,04	0,04	0,04
0	-0,05	-0,04	-0,04	-0,03

1248

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	P value	IC 95%
0 vs 15	-0,01667	0,4167	P > 0.05	-0.1323 to 0.09893
0 vs 25	-0,02	0,5	P > 0.05	-0.1356 to 0.0956
0 vs 45	-0,02333	0,5833	P > 0.05	-0.1389 to 0.09227
0 vs 65	-0,02333	0,5833	P > 0.05	-0.1389 to 0.09227

1249

1250

1251

1252 **8. Dados referentes à toxicidade de luz emitida pelo FLH sobre biofilme de *S. mutans*.**

1253

1254

Tempo (s)				
0	20	30	40	60
Δ pH				
0	0,03	0,05	0,03	0,04
0	0,04	0,01		
0	0	0,02	0,04	0,03

1255

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 20	-0,02333	2,141	P > 0.05	-0.05549 to 0.008824
0 vs 30	-0,02667	2,446	P > 0.05	-0.05882 to 0.005491
0 vs 40	-0,035	2,832	P > 0.05	-0.07146 to 0.001463
0 vs 60	-0,035	2,832	P > 0.05	-0.07146 to 0.001463

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274 **9. Dados referentes à toxicidade da Eosina sobre biofilme de *S. mutans*.**

1275

1276

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	0,8	1,6	3,3	6,6
Δ pH				
0	-0,17	-0,12	0,13	0,03
0	-0,18	-0,12	0,07	0,21
0	0,07	-0,12	0,15	0,13
0	0,08	-0,02	0,27	0,7
0	0,1	0,02	0,47	1,22
0	0,07	0,24	0,69	1,36
0	0,05	0,11	0,3	0,49
0	0,13	0,07		0,34
		0,43		0,24
		0,2		1,81
				1,4
				1,09

1277

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 0,8	-0,01875	0,1102	P > 0.05	-0.4510 to 0.4135
0 vs 1,6	-0,069	0,4274	P > 0.05	-0.4791 to 0.3411
0 vs 3,3	-0,2971	1,687	P > 0.05	-0.7446 to 0.1503
0 vs 6,6	-0,7517	4,839	P < 0.01	-1.146 to -0.3571

1278

1279

1280

1281

1282

1283

1284

1285

1286

1287

1288

1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

1303

1304

1305 **10. Dados referentes à toxicidade do Rose Bengal sobre biofilme de *S. mutans*.**
 1306
 1307

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	6,6	13,3	26,6	53,3
Δ pH				
0	-0,17	0,75	0,69	0,11
0	-0,25	0,66	0,59	0,25
0	-0,22	0,86	0,61	0,25
0	-0,16	0,74	0,68	0,8
0	-0,2	-0,31	0,85	0,09
0	-0,21	-0,24	0,72	0,32
0	-0,25	-0,17	-0,09	0,25
0	-0,26	-0,18	-0,17	0,3
0	-0,24	0,08	-0,23	0,27
0	0,11	0,03	0,3	0,21
0	-0,01	0,18	0,17	0,15
0	-0,01	0,09	0,2	0,52
0	0,41	-0,26	0,08	0,44
0	0,99	-0,26	0,01	0,35
0	0,8	-0,08	0,07	0,17
0	0,75	-0,28	0,27	0,64
0	0,57	0,5	0,24	0,46
0	-0,19	0,41	0,27	0,36
0	-0,16	0,73	-0,16	
0	-0,19	0,39	-0,05	
	-0,25		-0,17	
	-0,33		0,13	
	-0,27		-0,05	
	0,53		-0,09	
	0,43		0,63	
	0,46		0,43	
	0,44		0,26	
	0,33			
	0,4			
	0,08			

1308

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 6,6	-0,09767	1,08	P > 0.05	-0.3217 to 0.1264
0 vs 13,3	-0,182	1,837	P > 0.05	-0.4274 to 0.06340
0 vs 26,6	-0,2293	2,48	P < 0.05	-0.4582 to -0.0003159
0 vs 53,3	-0,33	3,242	P < 0.01	-0.5821 to -0.07787

1309
 1310
 1311
 1312
 1313
 1314
 1315
 1316
 1317
 1318

1319 **11. Dados referentes ao efeito da TFD com Rose Bengal e FLH (60s) biofilme de *S.***
 1320 ***mutans*.**

1321
 1322

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	6,6	13,3	26,6	53,3
Δ pH				
0	-0,01	0,58	0,44	0,17815
0	0	0,01	0,44	0,20869
0	-0,02	0,1	0,13	0,38684
0	0,13	0,26	0,14	0,37157
0	0,52	0,38	0,37	0,40211
0	0,32	0,29	0,27	0,31558
0	0,09	0,2		0,18324
0	0,04	0,04		0,22905
0	0,12	0,05		0,29522
0	0,39	0,07		0,17815
0	0,28	0,58		0,46319
0	0,3	0,49		0,48355
0		0,4		0,39702

1323

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 6,6	-0,18	3,085	P < 0.05	-0.3272 to -0.03283
0 vs 13,3	-0,2654	4,642	P < 0.01	-0.4096 to -0.1212
0 vs 26,6	-0,2983	4,147	P < 0.01	-0.4798 to -0.1169
0 vs 53,3	-0,3148	5,506	P < 0.01	-0.4590 to -0.1706

1324
 1325
 1326
 1327
 1328
 1329
 1330
 1331
 1332
 1333
 1334
 1335
 1336
 1337
 1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348

1349 **12. Dados referentes ao efeito da TFD com Rose Bengal e LED (65s) biofilme de *S.***
 1350 ***mutans*.**

1351
 1352

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	6,6	13,3	26,6	53,3
Δ pH				
0	0,2	1,37	1,19	0,71
0	-0,1	1,32	0,8	0,82
0	0,13	1,3	0,86	0,44
0	0,4	0,95	1	1,32
0	1,51	0,63	0,65	1,13
0	0,93	0,79	1,06	1,24
0	1,79	1,15	0,96	0,96
0	1,87	1,11		1,04
0	1,73	0,84		1,06
0	-0,05	0,07		0,67
0	0,13	0,2		1,42
0	0,23	-0,12		1,45
0	1,07	1,57		1,42
0	0,88	1,49		
0	0,77	1,3		

1353
 1354

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 6,6	-0,766	4,652	P < 0.01	-1.179 to -0.3527
0 vs 13,3	-0,9313	5,657	P < 0.01	-1.345 to -0.5181
0 vs 26,6	-0,9314	4,513	P < 0.01	-1.449 to -0.4134
0 vs 53,3	-1,052	6,159	P < 0.01	-1.481 to -0.6235

1355
 1356
 1357
 1358
 1359
 1360

13. Dados referentes ao efeito da TFD com Eosina e FLH (60s) biofilme de *S. mutans*.

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	0,8	1,6	3,3	6,6
Δ pH				
0	0,69	0,88	3,28	3,1
0	0,67	0,61	3,66	3,95
0	0,75	3,9	4,03	3,42
0	2,4	3,95	4,11	5,26
0	2,83	4,49	4,3	5,5
0	3,04			5,47

1361

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 0,8	-1,73	2,766	P < 0.05	-3.369 to -0.09112
0 vs 1,6	-2,766	4,216	P < 0.01	-4.485 to -1.047
0 vs 3,3	-3,876	5,908	P < 0.01	-5.595 to -2.157
0 vs 6,6	-4,45	7,114	P < 0.01	-6.089 to -2.811

1362
 1363

1364 **14. Dados referentes ao efeito da TFD com Eosina e LED (65s) biofilme de *S. mutans*.**

1365

1366

Concentrações x10 ⁻⁷ mol/L				
0	0,8	1,6	3,3	6,6
Δ pH				
0	3,22904	3,71072	3,63936	3,7464
0	3,46096	3,71072	3,69288	3,81776
0	3,51448	3,7464	2,65816	3,87128
0	0,74928	1,35584	2,96144	3,05064
0	0,66008	0,83848	3,49664	2,90792
0	0,8028			

1367

1368

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 0,8	-2,069	3,687	P < 0.01	-3.546 to -0.5933
0 vs 1,6	-2,672	4,54	P < 0.01	-4.221 to -1.124
0 vs 3,3	-3,29	5,588	P < 0.01	-4.838 to -1.741
0 vs 6,6	-3,479	5,909	P < 0.01	-5.027 to -1.931

1369

1370

1371

1372 **15. Dados referentes à variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina**

1373 **(C=0,8x10⁻⁷ mol/L) e FLH.**

1374

1375

0	20	30	40	60
Δ pH				
0	0,54	0,66	1,28	1,71
0	0,68	0,75	1,25	1,71
0	0,56	0,83	1,26	1,77
0	0,7	0,85	1,3	1,77

1376

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 20	-0,62	15,57	P < 0.01	-0.7287 to -0.5113
0 vs 30	-0,7725	19,4	P < 0.01	-0.8812 to -0.6638
0 vs 40	-1,273	31,96	P < 0.01	-1.381 to -1.164
0 vs 60	-1,74	43,71	P < 0.01	-1.849 to -1.631

1377

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389

1390 **16. Dados referentes à variação do tempo de exposição à luz – Grupo Eosina**
 1391 **(C=0,8x10⁻⁷ mol/L) e LED.**
 1392
 1393

0	15	25	45	65
Δ pH				
0	1,22	1,6	2,04	2,13
0	1,16	1,65	2,03	2,15
0	1,14	1,65	2,06	2,17
0	1,34	1,75	2,07	1,84

1394

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 15	-1,215	20,06	P < 0.01	-1.380 to -1.050
0 vs 25	-1,663	27,45	P < 0.01	-1.828 to -1.497
0 vs 45	-2,05	33,85	P < 0.01	-2.215 to -1.885
0 vs 65	-2,073	34,22	P < 0.01	-2.238 to -1.907

1395

1396

1397

1398 **17. Dados referentes à variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal**
 1399 **(C= 6,6x10⁻⁷ mol/L) e LED.**
 1400
 1401

0	15	25	45	65
Δ pH				
0	0,28	0,28	0,3	0,69
0	0,22	0,29	0,33	0,6
0	0,28	0,27	0,39	0,95
0	0,29	0,3	0,44	0,79

1402

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 15	-0,2675	5,093	P < 0.01	-0.4109 to -0.1241
0 vs 25	-0,285	5,427	P < 0.01	-0.4284 to -0.1416
0 vs 45	-0,365	6,95	P < 0.01	-0.5084 to -0.2216
0 vs 65	-0,7575	14,42	P < 0.01	-0.9009 to -0.6141

1403

1404

1405

1406

1407

1408

1409

1410

1411

1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418

1419 **18. Dados referentes à variação do tempo de exposição à luz – Grupo Rose Bengal**
 1420 **(C= 6,6x10⁻⁷ mol/L) e FLH.**

1421

1422

0	20	30	40	60
Δ pH				
0	0,2	0,21	0,23	0,23
0	0,15	0,23	0,2	0,28
0	0,15	0,19	0,2	0,31
0	0,12	0,19	0,2	0,3

1423

Teste de comparação múltipla Dunnett's	Mean Diff.	q	Valor P	IC 95%
0 vs 20	-0,155	9,012	P < 0.01	-0.2020 to -0.1080
0 vs 30	-0,205	11,92	P < 0.01	-0.2520 to -0.1580
0 vs 40	-0,2075	12,06	P < 0.01	-0.2545 to -0.1605
0 vs 60	-0,28	16,28	P < 0.01	-0.3270 to -0.2330

1424

1425

1426

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)