

AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA PELO *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Bevilacqua I. M.^{1,2}, Nicolau, R. A.^{1,2}, Khouri, S.¹, Teodoro, G.R.¹, Zângaro, R. A.^{1,2}, Pacheco, M.T.T.¹

¹ Universidade do Vale do Paraíba (Univap), Faculdade de Ciências da Saúde

² Univap, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Biomodulação Tecidual (BIOTEC)/Centro de Laser em Odontologia
ibevilacqua@directnet.com.br, rani@univap.br, soniak@univap.br, gteodoro@univap.br, zangaro@univap.br, mtadeu@univap.br

Resumo- A placa bacteriana é constituída de bactérias, células epiteliais descamadas, macromoléculas e restos alimentares, que se aderem à superfície do dente e constituem o primeiro passo para do desenvolvimento da cárie dentária. Os lasers quando associados a corantes (substâncias fotossensibilizadoras), provocam morte celular, eliminando as bactérias em um curto período de tempo, processo hoje conhecido como terapia fotodinâmica. O *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico da doença, e sua redução é essencial para prevenir o risco de cárie. Este estudo avaliou a ação da substância fotossensibilizadora - azul de toluidina (100µg/ml) irradiada com LED (diodo emissor de luz - 640nm), com 116 mW de potência sobre um meio de cultura (caldo sacarado) com *Streptococcus mutans*. Foram preparadas amostras, divididas em quatro grupos: 1-grupo controle (+), 2- azul de toluidina, 3-LED e azul de toluidina, 4- somente LED. Foi feita a avaliação da formação de placa bacteriana nas amostras através de fotografia digital e microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permitiu concluir a redução de placa bacteriana no grupo tratado com LED e azul de toluidina.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, *S. mutans*, LED.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

Introdução

Atualmente, a prevenção tem sido de fundamental importância em vários segmentos da área da saúde, e como a odontologia é uma especialidade atenta à prevenção, as causas da cárie vêm sendo estudadas exaustivamente.

A placa bacteriana está relacionada às fases iniciais do desenvolvimento da cárie dentária, que também constitui uma doença microbiana e infecto-contagiosa. A cárie atinge os tecidos calcificados dos dentes, causando primeiramente desmineralização da parte inorgânica, progredindo para a destruição da parte orgânica do dente. Clinicamente existe uma grande limitação entre a identificação de zonas infectadas das estruturas dentais sadias, culminando, muitas vezes, em remoção de tecido sadio durante os procedimentos restauradores (BURNS et al., 1994). Atualmente, o tratamento da doença cárie consiste na remoção bacteriana mecânica (curetas e brocas), eliminando todo ou parte do tecido contaminado. Vários métodos alternativos estão sendo estudados com a finalidade de encontrar uma maneira menos invasiva, menos dolorosa e mais rápida na remoção da cárie.

Na odontologia, os lasers e LEDs estão sendo utilizados principalmente como auxiliares na redução bacteriana (GARCEZ et al., 2003, ZANIN, 2005). Na maioria dos casos, são lasers de alta

potência, que emitem grandes intensidades luminosas, causando danos aos tecidos dentais. No entanto os lasers de baixa potência, quando associados a corantes, podem levar à morte ou redução dos microrganismos, sem causar danos ao organismo, processo conhecido como Terapia Fotodinâmica.

Vários estudos foram realizados associando diferentes substâncias fotossensibilizadoras a lasers de baixa potência com vários comprimentos de onda (WILSON et al., 1992; BURNS et al., 1994). A substância fotossensibilizadora (corante) funciona como um agente de absorção óptica ou cromóforo, que após irradiação gera fluorescência. Esta por sua vez, causa citotoxicidade no meio. É fundamental o uso de um corante adequado ao comprimento de onda da fonte de luz de excitação. Buscando fontes alternativas de irradiação, o emprego do LED na região do vermelho do espectro eletromagnético tem sido investigado de forma incipiente. Assim, a proposta deste estudo foi avaliar o efeito, *in vitro*, do LED (640 nm) associado ao azul de toluidina (AOT) sobre a dinâmica de formação de placa bacteriana pelo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*).

Materiais e Métodos

Confecção do corpo de prova: Capilares de vidro foram aquecidos para poderem formar

alças, e dar um formato semelhante a uma bengala. Os corpos de prova utilizados foram confeccionados manualmente, por um único indivíduo para padronizar o tamanho dos mesmos. Todas as bengalas foram esterilizadas em autoclave vertical (Phoenix AV 75), colocadas em meio de cultura durante o processo de formação de placa bacteriana. As amostras (tubo de ensaio, bengala de vidro e meio de cultura) foram divididas em quatro grupos:

GRUPO 1: controle (+);

GRUPO 2: tratado com AOT (100 µg/mL);

GRUPO 3: tratado com AOT (100 µg/mL) e fotossensibilizado com LED (terapia fotodinâmica);

GRUPO 4: irradiado com LED.

Uma bengala foi utilizada como controle negativo.

Cepa utilizada: O microrganismo utilizado foi o *S. mutans* (ATCC 25175). A concentração foi obtida utilizando a escala Mac Farland, adicionando com alças descartáveis de 10µL cepas do microrganismo e comparando a turvação dos tubos com a escala de 0,5 Mac Farland. A concentração final obtida foi de $1,5 \times 10^8$ (150 milhões) de *S. mutans* por mL do meio.

Meio de cultura: O meio de cultura utilizado foi o caldo sacarosado, contendo: 20g de TSB (caldo triptico de soja), 2g de cloreto de sódio, 3g de fosfato de potássio dibásico, 2g de fosfato de potássio monobásico, 1g de carbonato de potássio, 0,12g de sulfato de magnésio, 0,015g de sulfato de manganês e 50g de sacarose. Os ingredientes foram diluídos em 1 litro de água destilada, aquecidos até a diluição completa. O caldo sacarosado foi dividido em todos de ensaio e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C, depois foi mantido por 24 horas em estufa (incubadora Fanem 002 DB) a 37°C para confirmar a esterilidade do mesmo.

Luz utilizada: A luz utilizada foi um LED (*light emitting diode*, em português, diodo emissor de luz) emitindo radiação eletromagnética em 640 nm (Microdont), com potência média de emissão de 116mW, por um período de 480s. À distância do feixe até a bengala foi de 2,0cm, e a área irradiada foi de 9,62cm², a uma densidade de energia de 5,78J/cm².

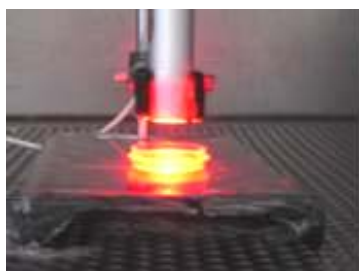


Figura 1- Irradiação sobre a placa de Petri.

Substância Fotossensibilizadora: A substância fotossensibilizadora utilizada foi o azul de toluidina (Fórmula & Ação) com concentração de 100 µg/mL, com pH de 5. (BURNS et al., 1994; De SIMONE et al., 1999; KOMERICK et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004)

Resultados

Primeiramente foram registradas fotografias digitais das bengalas de vidro. Através da análise de imagem magnificada em 3 vezes, observou-se a formação de placa bacteriana em todos os grupos experimentais. Contudo no grupo 3, os resultados mostraram que o LED associado ao azul de toluidina reduziu a formação de placa bacteriana em comparação com os demais grupos.



Figura 2 - Presença de placa bacteriana evidenciada nos grupos 1 (a), 2 (b) e 4(c).



Figura 3 – Redução de placa bacteriana na superfície do vidro do grupo 3.

Através da análise qualitativa das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das bengalas do grupo 3, observou-se a redução da formação de placa bacteriana, com padrões semelhantes ao controle negativo (bengala de vidro) conforme figura 4 abaixo.

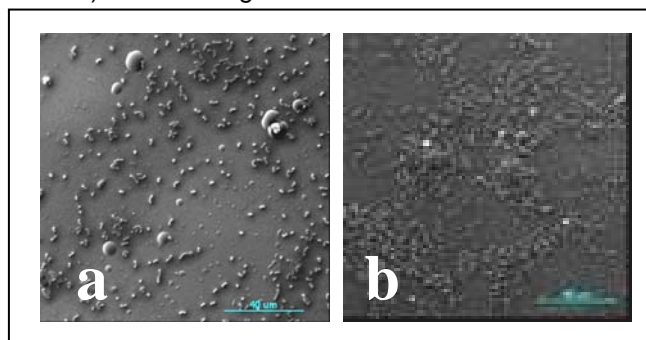


Figura 4– MEV Grupo 3 (a) e controle negativo (b). 1000x.

Nas imagens dos grupos 1, 2 e 4, não ocorreu mudança na conformação estrutural das bengalas de vidro, como mostra as figuras 5 e 6 (a e b).

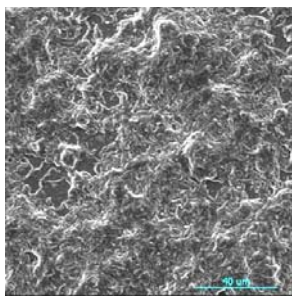


Figura 5 - MEV Grupo 1. 1000x.

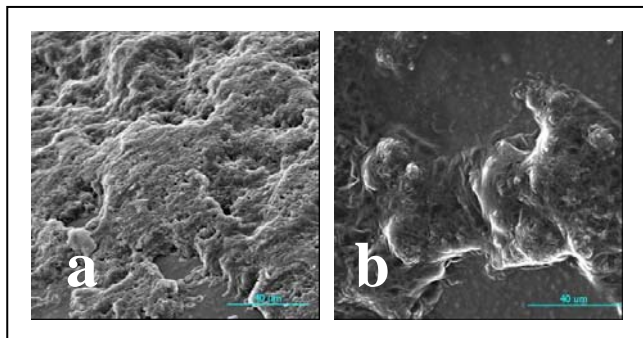


Figura 6 –MEV Grupo 2 (a) e 4 (b). 1000x.

Discussão

Emprego adequado da terapia fotodinâmica (TFD), como método alternativo na eliminação de microrganismos patológicos do meio bucal, tem norteado de forma expressiva a realização de pesquisas na área médica e tecnológica (PAULINO et al., 2005). O uso de um laser de baixa potência associado a um agente fotossensibilizador (corante) vem sendo utilizado em vários estudos com o objetivo de redução microbiana, tendo como vantagem a efetivação desta em curto período de tempo (segundos ou minutos), podendo ser uma alternativa ao uso de antibióticos e anti-sépticos (WILLIAMS et al., 2004). Atualmente, os LEDs estão surgindo como uma fonte de luz alternativa na TFD aplicada à redução bacteriana (ZANIN et al., 2003). Em 2005, Zanin et al., estudaram a redução de *Streptococcus mutans* com azul de toluidina associado a um laser de He-Ne comparado a um LED *in vitro*, onde verificaram a significativa redução microbiana (99,99%), independente da fonte de luz utilizada (LED ou laser na região do vermelho do espectro eletromagnético). Porém, muitos estudos têm demonstrado que as bactérias, quando presentes em um biofilme, são mais resistentes ao tratamento do que quando estão presentes em meios de cultura (ZANIN et al., 2002), sendo necessário o emprego de vários corantes e diversas fontes de luz para que ocorra efeito antibacteriano, mostrando a necessidade de estudos *in vivo* para confirmar a eficiência da

terapia. O emprego da luz não polarizada dos LEDs é atestada como válida nesta terapia, pois a relação de interação luz-corante se mantém apropriada, pois para produzir efeito antibacteriano, os corantes devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada (WILSON et al., 1992, GARCEZ et al., 2003). No presente estudo empregou-se um LED com comprimento de onda de médio de 640nm, uma vez que o pico de absorção do corante estudado (azul de toluidina) está entre 620-700nm (GARCEZ et al., 2003). O azul de toluidina foi utilizado a 100 µg/mL, pois nesta concentração não causa dano aos tecidos bucais (manchamento dos dentes e toxicidade celular) (BURNS et al., 1994; De SIMONE et al., 1999; KOMERICK et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004). O pH da substância foi de 5 para não causar dano bacteriano somente pela presença da droga (BURNS et al., 1995; WILLIAMS et al., 2004). Os resultados obtidos demonstraram que a redução da placa bacteriana ocorreu somente quando o LED e o corante (grupo 3) foram aplicados simultaneamente. O uso de corante ou LED, isoladamente, sobre a bactéria estudada, não promoveu modificações na formação de placa. Estes dados corroboram estudos realizados com TFD, empregando laser associado a corante na redução microbiana (OKAMOTO et al., 1992; WOOD et al., 1999, WILLIAMS et al., 2004, SHILIBI et al., 2003; ZANIN et al., 2005). Os resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro com dados obtidos por Zanin et al. em 2005, os quais atestam que o uso do corante ou LED sozinho não causa redução bacteriana significativa. Este fato torna possível o uso da terapia de forma seletiva no que se refere à cariologia clínica (WILSON, 1994).

Conclusão

A terapia fotodinâmica inibiu a aderência do *S. mutans* à bengala de vidro, reduzindo a formação de placa bacteriana nessa superfície.

Referências

- BURNS, T., WILSON, M., PEARSON, G.J. Killing of bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J Dent**, v.22, p.273-278, 1994.
- BURNS, T. WILSON, M., PEARSON. Effect of Dentine and Collagen on the Lethal Photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v.29, p.192-197, 1995.
- DeSIMONE, N.A., CHRISTIANSEN, C, DORE, D. Bacterial effect of 0,95 mW helium-neon and 5 mW indium-gallium-aluminium-phosphate laser

irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Phys Ther**, v. 79, n. 11, p.1082, nov, 1999.

- GARCEZ, A. S. SOUZA, F. R., NÚÑEZ, S. C., KATHER, J.M., RIBEIRO, M.S. Terapia Fotodinâmica em Odontologia - Laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev APCD**, v.57, n.3, p. 223-226, mai/jun. 2003.

- KOMERIK, N., NAKANISHI, H., MaC ROBERT, A.J., HENDERSON, B., WILSON, P. In Vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue. Photosensitization in an Animal Model. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.3, p.932-940, mar.2003.

- OKAMOTO, H. IWASE, T., MORIOKA, T. Dye-Mediated Bacterial Effect of He-Ne Laser Irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers Surg Med**, v.12, p.450-458, 1992.

- PAULINO, T. P., RIBEIRO, K. F., THEDEI, G. Jr, Tedesco, A. C., CIANCAGLINI, P., Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*, **Arch Oral Biol**, v. 50, n.3, p.353-359, march 2005.

- SHIBILI, J. A., MARTINS, M. C., THEODORO, L. H. et al., Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. **J Oral Sci**, v.45, n.1, p.17-23, 2003.

- WILLIMAS J.A., PEARSON G.J., COLLES M.J., WILSON M. The photo-activated Antibacterial Action of Toluidine Blue O in a Collagen Matrix and in Carious Dentine. **Caries Res**, v.38, p.530-536, 2004.

- WILSON M., Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int Dent J**, v.44, n.2, p.181-9, 1994.

- WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser irradiation. **Curr Microbiol**, v.25, n.2, p.77-81, ago.1992.

- WOOD, S., NATTRESS, B., KIRKHAM, J., SHORE, R., BROOKES, S., An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J Photochem Photobiol B**, P.1-7, 1999.

- ZANIN, F.A.A., GONÇALVES, R. B., Terapia fotodinâmica na odontologia. **RGO**, n.51, v.3, p.179-182, 2003.

- ZANIN, I.C.J., GONÇALVES, R.B., BRUGNERA JUNIOR, A., Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an vitro study. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.2, p.324-30, june, 2005.