

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOBRE BIOFILME MICROCOSMOS DE ESTOMATITE PROTÉTICA

Amanda Siqueira Fraga, Paulo Henrique Fonseca do Carmo, Juliana Campos
Junqueira.

Universidade Estadual Paulista/UNESP – Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) - Campus de São
José dos Campos, Avenida Engenheiro Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas - 12245-000 -
São José dos Campos-SP, Brasil, as.fraga@unesp.br, phf.carmo@unesp.br,
juliana.junqueira@unesp.br.

Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) atua por meio de processos fotodinâmicos que ocorrem pela atividade do fotossensibilizador (FS) que ao ser excitado por uma fonte de luz em um comprimento de onda específico, interage com o oxigênio molecular e resulta na produção de espécies reativas de oxigênio. Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana da curcumina (CUR) como FS na TFD sobre biofilmes microcosmos de estomatite protética. Metodologia: O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do ICT/Unesp (nº 5.827755) para coleta de amostra de paciente com estomatite protética. A atividade antimicrobiana da CUR sobre os biofilmes microcosmos formados *in vitro* foi determinada pela viabilidade celular. Resultados: No geral a TFD reduziu 2,1 log₁₀ do total dos microrganismos, 1,6 log₁₀ dos estreptococos, 2,0 log₁₀ dos estreptococos do grupo *mutans*, 1,5 log₁₀ dos lactobacilos, 3,7 log₁₀ dos estafilococos e 1,1 log₁₀ das leveduras. Conclusões: A TFD associada a CUR foi capaz de reduzir o número de microrganismos totais, estreptococos, estafilococos, lactobacilos e leveduras dos biofilmes microcosmos coletado de pacientes com estomatite protética.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Biofilme microcosmos. Estomatite protética.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde, Odontologia.

Introdução

A estomatite protética caracteriza-se por uma lesão assintomática que acomete cerca de 75% dos usuários de prótese. De modo, concomitante pode ocorrer colonização fúngica da superfície das próteses acarretando inflamação crônica da mucosa, desconforto e sensação de ardência, o que influencia negativamente a qualidade de vida do paciente. Nesses casos *Candida albicans* é o agente de maior relevância na origem, manutenção e agravamento da estomatite protética. (CONTALDO *et al.*, 2019, HELLSTEIN *et al.*, 2019).

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e imersas em uma matriz exopolimérica autoproduzida. Esta organização reduz a sensibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, tornando as infecções associadas a biofilme um grande desafio clínico. Na pesquisa, os biofilmes podem ser analisados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os biofilmes *in vitro* envolvem fatores bem regulados, o que os distanciam das situações reais em que ocorrem no hospedeiro. Em contrapartida, os biofilmes *in vivo*, exigem modelos experimentais bem definidos, o que pode ser extremamente complexo e de difícil execução. Neste cenário, uma alternativa é o modelo de biofilme microcosmo que exhibe capacidade de reproduzir em condições laboratoriais a biodiversidade da cavidade oral humana, suprimindo as limitações do estudo *in vitro*. Para tanto, o biofilme é estabelecido a partir de material biológico coletado de um sítio de infecção, representando a biodiversidade do biofilme devido a presença de microrganismos de diferentes espécies ou mesmo de diferentes reinos, como bactérias e fungos. Soma-se a esse cenário a resistência que os microrganismos têm exibido frente a terapia antimicrobiana convencional, reforçando a importância de se estabelecer novas terapias antifúngicas (ARAÚJO *et al.*, 2022, TALAPKO *et al.*, 2021, MÉNDEZ *et al.* 2018)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Neste contexto a TFD tem assumido papel de destaque. A TFD atua por meio de processos fotodinâmicos que ocorrem pela atividade de FS que, quando excitado por uma luz em comprimento de onda específico interage com o oxigênio molecular presente no ambiente e resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os ERO, por sua vez, atuam sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos presentes na superfície e no interior das células, levando a morte celular. A TFD tem se demonstrando um método eficaz na eliminação seletiva de microrganismos, sobretudo contra cepas resistentes aos antimicrobianos clínicos. Além disso, a TFD apresenta como vantagem a baixa probabilidade de indução de resistência microbiana por apresentar múltiplos alvos de ação. (EVANGELISTA *et al.*, 2021, RIGOTTO *et al.*, 2021).

Centenas de substâncias são atualmente conhecidas como FS, como a CUR. Além de ser empregada na culinária, a CUR também tem aplicação potencial em medicamentos devido às suas propriedades terapêuticas associadas, efeitos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatórios e antimicrobianos. A CUR é praticamente insolúvel em água mas solúvel em solventes como metanol, etanol, DMF, DMSO, etc. A CUR em solução, apresenta forte absorção na região do azul do espectro eletromagnético com absorção máxima na faixa de 408 a 434 nm. Além disso, a CUR não exibiu efeitos tóxicos em diferentes tipos celulares e em estudos envolvendo animais. (Chignell *et al.*, 1994, SANTEZI *et al.*, 2021)

Neste cenário, o emprego de compostos naturais para a TFD tem representado estratégias promissoras na terapêutica antimicrobiana. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos da TFD mediada por CUR sobre biofilmes microcosmos, cultivado a partir da amostra obtida de pacientes com estomatite protética.

Metodologia

A obtenção da amostra de paciente com estomatite protética para formação do biofilme microcosmos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT- Unesp) do campus de São José dos Campos pelo número 5.827755.

Participou do estudo 1 voluntário diagnosticado com candidíase bucal associado à presença de prótese total. A coleta foi realizada em uma Unidade Básica de Saúde localizada na cidade de São José dos Campos-SP. Os critérios de inclusão são indivíduos portadores de prótese total ou prótese parcial removível, não havendo dependência de idade, condição socioeconômica, etnia ou gênero. O critério de exclusão foi não ter feito uso de antibióticos, antifúngicos ou corticóides nos últimos 60 dias. O participante disposto a participar do estudo assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de escovas cervicais por meio de fricção da lesão do palato. Além da coleta na região do palato, foram coletadas amostras da prótese dentária. As amostras coletadas foram armazenadas em tubos cônicos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) estéril e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do ICT/ UNESP em no máximo 3 horas após a coleta.

A seguir, a presença de *Candida* spp. na amostra coletada foi confirmada, por meio da observação de campos microscópicos distintos do esfregaço corado pelo método de Gram (em aumento de 1.000x). As amostras também foram semeadas em meios de cultura seletivos cromogênicos para identificação presumida de microrganismos. Após a confirmação da presença de células e colônias sugestivas de *Candida* spp, as amostras foram congeladas em freezer -80 C°.

Corpos de prova em resina acrílica termopolimerizável à base de polimetilmetacrilato, que é rotineiramente utilizada na confecção de próteses dentárias, foram confeccionados. Os corpos de prova foram preparados com 5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura.

Para a formação dos biofilmes microcosmos foi seguida a metodologia de Méndez *et al.* (2018) com algumas modificações. As amostras do material foram descongeladas e homogeneizadas. Então, 400 µL foi adicionado em 20 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose e levado para estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, a amostra foi centrifugada, a 5000 RPM, por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose.

Posteriormente, os corpos de prova foram autoclavados e posicionados em placa de 24 poços. Com os corpos de prova devidamente posicionados, foi acrescentado 2 mL de caldo BHI com

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

5% de sacarose e 225 μ L do inóculo foi adicionado em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 96 h a 5% de CO₂, de modo que os poços foram lavados e 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose fresco foi adicionado a cada 24 h.

Para a realização da fotossensibilização *in vitro* utilizou-se a metodologia descrita por Garcia *et al.* (2018), com algumas modificações.

Após a formação do biofilme, os corpos de prova foram posicionados na intersecção dos poços da placa de 24 poços, para que fosse possível o uso de um volume mínimo de FS. Os grupos experimentais utilizados foram: grupo sem CUR e sem irradiação (C-L-); grupo com CUR e sem irradiação (C+L-); grupo sem CUR com irradiação, (C-L+); e grupo com CUR e com irradiação (C+L+). Assim, foi adicionado 200 μ L de curcumina 50 μ M (Sigma- Aldrich; St. Louis, Missouri, USA), solubilizada em etanol (concentração final de 2%), conforme os grupos experimentais. As placas foram protegidas da luz e mantidas a temperatura ambiente por um tempo de pré-irradiação de 5 minutos, seguindo a metodologia descrita por Andrade *et al.* (2013), com algumas modificações. Em seguida os grupos experimentais que receberam luz foram irradiados utilizando o dispositivo Emitter G que possui emissores de luz (LED) utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 420 - 480 nm, potência de luz de 1250 mW/cm², gerando densidade de energia de 131,5 J/cm² por 40 s, totalizando uma densidade de potência de 3,28 W.

Após a fotossensibilização *in vitro*, os biofilmes aderidos aos corpos de prova foram desprendidos utilizando homogeneizador ultrassônico com potência de 7 W por 30 s. A partir da solução obtida, diluições seriadas da suspensão do biofilme foram realizadas e alíquotas foram semeadas em placas contendo meios de cultura específicos: ágar Mitis Salivarius para contagem de estreptococos, ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS) para contagem de estreptococos do grupo mutans, ágar Rogosa para contagem de lactobacilos, ágar Manitol para contagem de *Staphylococcus* e ágar Sabouraud com cloranfenicol para contagem de leveduras. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Resultados

Houve crescimento microbiano nos meios ágar BHI, Mitis Salivarius, MSBS, Manitol, Sabouraud com cloranfenicol e Rogosa. A contagem de microrganismos no meio não seletivo BHI, nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,0 log₁₀. Nos grupos C+ L- e C+ L+, a inibição foi significativa quando comparado aos grupos controle. Para o grupo C+L+, houve uma redução em relação ao grupo controle de 2,1 log₁₀. O grupo C+L- também apresentou redução na contagem microbiana total de aproximadamente 1,8 log₁₀ quando comparado ao grupo C-L- .

Na contagem total dos estreptococos, foi possível observar que os grupos controles (C-L- e C-L+) apresentaram um crescimento médio de 5,5 log₁₀. No grupo C+L+, a inibição foi de 1,6 log₁₀ quando comparado aos grupos controle. O grupo C+L- não apresentou redução significativa em relação ao grupo C-L- .

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans*, foi possível observar um crescimento médio na contagem de 5,8 log₁₀ nos grupos controles (C-L- e C-L+). Houve inibição de 2,0 Log₁₀ para o grupo C+L+ quando comparado ao grupo controle. O grupo C+L- não exibiu redução significativa em relação ao grupo C-L- .

Os grupos controles (C-L- e C-L+) apresentaram um crescimento médio de 5,0 log₁₀ para a contagem de lactobacilos. No grupo C+L+, houve inibição significativa de 1,5 log₁₀ quando comparado ao controle. O grupo C+L- também apresentou redução de aproximadamente 1,4 log₁₀ em relação ao grupo C-L- .

Na contagem de estafilococos, foi possível observar um crescimento médio 4,8 log₁₀ nos grupos controles (C-L- e C-L+). Houve redução de 3,7 log₁₀ para o grupo C+L+ quando comparado aos controles. O grupo C+L- não apresentou redução significativa em relação ao grupo C-L- .

A contagem de leveduras revelou um crescimento médio de 4,8 log₁₀ para os grupos controles (C-L- e C-L+). Em C+L+, houve inibição significativa em relação ao grupo controle, sendo essa redução de 1,1 log₁₀. O grupo C+L- não apresentou redução significativa em relação ao grupo C-L- .

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Muitos estudos sobre a eficácia da TFD são realizados e para isso diferentes metodologias e FS são utilizados. Neste estudo, utilizamos um modelo de biofilme microcosmos para avaliar a eficácia da TFD mediada por CUR. A contagem de microrganismos em meio não seletivo nos biofilmes tratados com a TFD foi significativamente menor em relação aos grupos não tratados. Isso deve-se em decorrência da atividade antimicrobiana resultante da associação da luz, FS e oxigênio que resultaram na formação de ERO. A seleção do FS adequado é de grande importância para o sucesso da TFD. Nesse caso, a CUR destaca-se por ser um produto natural, de baixo custo e com ação antimicrobiana contra diferentes microrganismos potencialmente patogênicos, reforçando sua capacidade de gerar fotoprodutos, ERO e desencadear fototoxicidade quando irradiada no comprimento de onda apropriado. (TONON *et al.*, 2015;; ABDULRAHMAN *et al.*, 2019)

Tonon *et al.* (2015) avaliaram o potencial da CUR como FS em TFD, observando uma redução bacteriana de 70% quando em comparação com os grupos de controle e confirmando a eficácia da CUR na TFD. Já Freitas *et al.* (2018) avaliaram a resposta da TFD com CUR contra *S. aureus* sensível à metilicina. Após incubação com CUR por 20 min e irradiação com LED em 450 nm., houve redução na carga bacteriana e o padrão de resistência ou sensibilidade aos antibacterianos não interferiu na resposta obtida.

Os biofilmes possuem um mecanismo de resistência capaz de modificar a expressão de genes relacionados à produção de bombas de efluxo, resultando em um efluxo aumentado do antimicrobiano para o meio extracelular, impedindo seu acúmulo no meio intracelular e, consequentemente, sua ação. Além disso, a matriz do biofilme pode diminuir a eficácia da TFD evitando a difusão do FS para dentro da célula. A proteção conferida pela matriz exopolimérica e a presença de células persistentes no biofilme também são fatores que aumentam a resistência dos microrganismos frente a terapia antimicrobiana convencional, o que reforça a importância do desenvolvimento de abordagens terapêuticas como a TFD (SAXENA *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2022).

Em conjunto, os resultados sugerem que os parâmetros utilizados na TFD podem ter ocasionado danos à membrana, favorecendo a internalização da curcumina e sua ação antimicrobiana. Embora a curcumina tenha exibido resultados promissores contra biofilme microcosmos, é necessário analisar essa atividade em um maior número de amostras para determinar seu potencial na prática clínica.

Conclusão

Concluímos que a TFD mediada por CUR foi eficaz contra biofilmes microcosmos. Os estafilococos e as leveduras foram os microrganismos mais suscetíveis, reforçando que a CUR representa um FS promissor para TFD direcionada ao tratamento de estomatite protética.

Referências

- ABDULRAHMAN, H. *et al.* Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, 2020.
- ANDRADE, M.C *et al.* Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Arch Oral Biol.**, v. 58, n. 2, p. 200-10, 2013. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.011.
- ARAÚJO, H.C. *et al.* In vitro antimicrobial effects of chitosan on microcosm biofilms of oral candidiasis. **J Dent.**, 2022.
- CHIGNELL, C.F. *et al.* Spectral and photochemical properties of curcumin. **Photochem Photobiol.** V. 59, n. 3, p. 295-302, 1994. doi: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CONTALDO, M. *et al.* Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 33, n. 3, Suppl. 1, p. 35-41, 2019.

EVANGELISTA, R. P. *et al.* Copolymer-nanocapsules of zinc phenyl-thio-phthalocyanine and amphotericin-B in association with antimicrobial photodynamic therapy (A-PDT) applications against *Candida albicans* yeasts. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 2021.

FREITAS, M. A. A. **Potencial Da Terapia Fotodinâmica Com Curcumina Na Inativação de Cepas De *Staphylococcus aureus* Sensíveis e Resistentes Aos Antibióticos** – Estudo in Vitro, Dissertação - (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2018.

GARCIA, M. T. **Clorina com fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans***. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

HELLSTEIN, J. W. , MAREK CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol.**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2019.

MÉNDEZ, D. A. C. *et al.* Effect of methyleneblue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. **Lasers Med Sci.**, v. 33, n. 3, p. 479–87, 2018. doi:10.1007/s10103-017-2379-3.

RIGOTTO, C. G. *et al.* Phenothiazinium Photosensitizers Associated with Silver Nanoparticles in Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, n. 5, 2021.

SANTEZI, C. *et al.* Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: Optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 35, 2021.

SAXENA, P. *et al.* Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. **Indian J Microbiol.**, v. 59, n. 1, p. 3-12, 2019.

TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 2, 2021.

TONON, C.C. *et al.* Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. **J Contemp Dent Pract.**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2015.