

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ROSA BENGALA QUANDO UTILIZADO EM TERAPIA FOTODINAMICA – ESTUDO PILOTO**

**LELES, Sávio Bisinoto<sup>1</sup>; PERALTA, Sonia Luque<sup>2</sup>; LEITE, Fábio Renato M.<sup>3</sup>; LUND, Rafael Guerra<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Odontologia pela Faculdade de Odontologia – UFPEL; <sup>2</sup>Doutoranda em Materiais Dentários pela Faculdade de Odontologia – UFPEL; <sup>3</sup>Professor Adjunto do Departamento de Semiologia e Clínica da Faculdade de Odontologia – UFPEL; <sup>4</sup>Faculdade de Odontologia – UFPEL, Departamento de Dentística Restauradora. savio\_bisinoto@hotmail.com.

### **1 INTRODUÇÃO**

O controle do biofilme dental pode ser feito por métodos mecânicos, como a escovação, métodos químicos, como o uso dos enxaguantes bucais ou com uma combinação dos dois métodos (Thylstrup, 1997). A cárie dental é uma doença que está relacionada com o acúmulo do biofilme dental e associada com o aumento de consumo de açúcares na dieta. O biofilme dental se forma na superfície dos dentes com o frequente consumo de açúcares, através da atividade de bactérias acidogênicas e acidúricas presentes na cavidade oral e que irão metabolizar e converter os açúcares em ácidos orgânicos (Marsh, 2003).

Quando uma comunidade de microorganismos torna-se intimamente aderida à superfície do dente na formação do biofilme, ela exhibe propriedades fenotípicas distintas e tende a adquirir uma resistência maior a agentes antimicrobianos (Hoyle, 1993). Além disso, tendo em vista o crescente problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, o uso de uma terapia alternativa onde as bactérias seriam incapazes de adquirir resistência seria de grande valor (Wilson, 1993).

A terapia fotodinâmica (TFD) pode ser um processo adequado para o combate do biofilme sem estar relacionado com a resistência a antimicrobianos. Utiliza-se nesta técnica um fotossensibilizador (como o azul de orto-toluidina), que é ativado por irradiação de um comprimento de onda específico (o máximo de absorção do sensibilizador) resultando na geração de espécies citotóxicas, incluindo átomos de oxigênio e radicais livres que são capazes de exercer um efeito bactericida (Malik, et. al., 1990), mas, que não são tóxicos para as células hospedeiras (Komerik et al., 2003; Paulino et al., 2005).

A TFD pode ser usada como uma forma terapêutica de tratamento da doença da cárie dental, visando fermentar os microorganismos presentes na superfície do dente com lesão cariada, e como técnica minimamente invasiva de eliminação das bactérias cariogênicas (Wilson, 2004). Esta técnica apresenta como vantagens ser de aplicação rápida, tópica, não invasiva, que elimina rapidamente as bactérias após uma breve exposição à luz e que apresenta pouca possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana, considerando o oxigênio como fator tóxico para espécies reativas a ele (anaeróbicas) (Nikolaos, 2011).

Fonte de luz vermelha tem sido muito utilizada devido seu longo comprimento de onda, que sugere uma maior eficácia na penetração do tecido vivo (Wilson, et. al., 1986) (bacteriano) em associação com fotossensibilizantes que absorvem mais este tipo de onda, tal como o azul de toluidina, podem ter efeitos bactericidas maiores.

Alguns estudos laboratoriais, usando o azul de toluidina, demonstraram susceptibilidade de bactérias cariogênicas tanto na fase planctônica (Williams et al, 2003; Rolim et al., 2011) quanto na fase de biofilme, para a terapia fotodinâmica (Zanin et al, 2006). E outros estudos demonstram que PDT tem a capacidade de diminuir bactérias orais em cultura planctônica (Paulino et al, 2005; Zanin et al, 2002) presentes na placa dental, (Wilson et al, 1995), bem como no biofilme (Wilson et al., 1996; Wood et al, 1999).

Tomando como base estes conhecimentos, este estudo se propôs avaliar a eficácia do rosa bengala como fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Discos de esmalte de 6mm de diâmetro foram obtidos de incisivos bovinos. As superfícies dos discos foram padronizadas com o auxílio de lixas d'água de granulação decrescente (240, 360, 600). Após isso, os discos foram colocados em suportes confeccionados com fio ortodôntico e autoclavados conforme protocolos já estabelecidos (Ccahuana 2004).

Este estudo foi realizado após formação de biofilmes em modelo estático em monocultura, com cepas de *S. mutans* da linhagem UA159. Depois de descongelados, os microrganismos foram reativados colocando as bactérias em um tubo Falcon de 15 ml, contendo 9 ml de LMW (low molecular weight) e 1% de sacarose. Depois disso, os tubos foram agitados em agitador de tubos Vórtex e incubados em estufa de CO<sub>2</sub> por 18 horas. Após verificado o crescimento das colônias de bactérias realizou-se a diluição em LMW, (starter) seguindo a escala de 0,5 de Mcfarland. Para o cultivo do biofilme foi preparado uma solução com 90% de meio, 10% de sacarose e por cada poço foi colocado 20ul/ml de starter (Li, 2009). Na placa de 24 poços foi colocado 2 ml deste meio e os discos suspensos. A troca do meio foi realizada a cada 24 horas por três dias. Manteve-se sempre em estufa de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37 °C.

No terceiro dia de formação de biofilme foi realizado a TFD, com 0,2ml do fotossensibilizante rosa bengala (diluído em água destilada em concentração de 25µg/ml), o mesmo que foi dispensado acima da formação do biofilme, e após 4 minutos (tempo de pré-irradiação) foi realizado a aplicação da luz vermelha, com uma densidade de energia máxima de 95 J/cm<sup>2</sup> por um tempo de um minuto e trinta segundos, a uma distância de 6mm do biofilme (Costa et. al., 2010). Passadas 24h da aplicação da TFD, a coleta do biofilme foi realizada de modo que os discos de esmalte foram imersos em eppendorfs de 2,0 ml com 1,0 ml de tampão fosfato salina, e sonicados. Posteriormente foi feita uma diluição seriada de 10 a 10<sup>-7</sup> onde as concentrações 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> foram plaqueadas em placas de BHI- Agar e Agar Mitis Salivarius e colocados em estufa de CO<sub>2</sub>. Passadas 48h foi realizado a quantificação das placas (contagem das unidades formadoras de colônias – UFC) por duas pessoas, com o auxílio de uma lupa estereoscópica sob luz refletida, com aumento de 20x.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando o grupo tratado com rosa bengala foi comparado com os grupos controles inicial e final, houve uma diferença estatística significativa. Onde no grupo tratado com o rosa bengala, não houve crescimento de colônias bactérias tanto nas placas de BHI-Agar (meio de cultura pouco seletivo para *S. Mutans*) quanto nas placas de Agar mitis Salivarius (meio de cultura seletivo para *S. Mutans*). Porém o presente trabalho é um ensaio piloto que apresenta algumas limitações como a quantidade de amostras que foi de quatro.

O consumo desenfreado de antibióticos e a automedicação fizeram com que nas últimas décadas a resistência bacteriana se tornasse um dos grandes problemas de saúde pública. Diante disso, a implementação de uma terapia que não causa resistência bacteriana, se tornou de grande importância. Neste sentido, a terapia fotodinâmica surge como um tratamento alternativo para a erradicação de microrganismos patógenos.

O presente estudo se torna interessante por avaliar a eficácia do efeito fotossensibilizador do azul de toluidina em biofilmes e não em bactérias planctônicas, já que os biofilmes são, muitas vezes, mais resistentes a medicamentos devido à proteção das matrizes extracelulares.

Paschoal (2009) utilizando o azul de toluidina demonstrou que a eficácia da TFD contra cepas de isolados clínicos de *S. mutans* dependia de uma concentração mínima do corante, associada a uma densidade de energia ( $J/cm^2$ ) mínima, cujos valores eram respectivamente  $2,5\mu g/ml$  de fotossensibilizador e iluminação a  $24 J/cm^2$ . Em seu estudo foram utilizadas diferentes doses de irradiação e concentrações do corante contra *S. mutans* com o intuito de avaliar o seu efeito antimicrobiano, obtendo resultados satisfatórios.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante do exposto fica entendido o forte potencial antibacteriano que o rosa bengala exerce sobre biofilmes formados por *S. mutans*, quando utilizado na terapia fotodinâmica, nas condições descritas. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de estabelecer protocolos para sua utilização na prática clínica.

#### 5 REFERÊNCIAS

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; TORRES, C. R. G.; ARAUJO, M. A.M.; ANIDO, A. A. Influence of the different lightcuring tips of LED photo-curing units in the microhardness of the composite resins. **Rev Odontol UNESP.**; 33 (2): 69-73; 2004.

COSTA, ACBP, CHIBELE, J. J, PEREIRA, CA, MACHADO, AKS, BELTRAME, J. M, JUNQUEIRA, JC, JORGE, AOC; Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode; **Braz Oral Res.** Oct-Dec;24(4):413-8;2010.

HOYLE, B.D, WILLIAMS, L.J, COSTERTON, J.W. Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Infect Immun** 61: 777–80;1993.

KOMERIK, N, NAKANISHI, H, MACROBERT, A.J et al. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother**, 47: 932–40;2003.

LI, Fang; CHEN, Jihua; CHAI, Zhiguo; ZHANG, Ling; XIAO, Yuhong; FANG, Ming; MA, Sai; Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. **Journal of dentistry**; 37 289 – 296;2009.

MALIK, Z, HANANIA, J, NITZAN, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins—an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol**, 5: 281–93;1990.

MARSH, P.D. **Are dental diseases examples of ecological catastrophes?** *Microbiology*; 149: 279–94; 2003.

NIKOLAOS S. SOUKOS & J. MAX GOODSON; Photodynamic therapy in the control of oral biofilms; **Periodontology 2000**, Printed in Singapore. All rights reserved, Vol. 55,143–166, 2011.

PASCHOAL, M. A. **Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogenicos presentes na saliva de crianças**. 2009. tese de mestrado em odontopediatria, faculdade de odontologia de Bauru USP.

PAULINO, T.P, RIBEIRO, K.F, THEDEI, G et al. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, 50: 353–9; 2005.

ROLIM, J.P.M.L et al.; The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers / **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** ;2011.

THYLSTRUO, A, FEJERSKV, O. **Textbook of Clinical Cariology**. 2nd ed. Munksgaard: Copenhagen, 1994.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci**, 3: 412–418;2004.

WILSON, M, BURNS, T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrob Chemother**, 37: 377–81;1996.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol** ,75: 299–306; 1993.

ZANIN, I.C, LOBO, M.M, RODRIGUES, L.K, PIMENTA, L.A, HOFLING, J.F, GONÇALVEZ, R.B. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci**: 114: 64–69;2006.