



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**FRANCISCA JAMILA RICARTE ALEXANDRINO**

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM ROSA BENGALA EM NANOFORMULAÇÃO  
COM ALFA-CICLODEXTRINA CONTRA SUSPENSÕES DE *Streptococcus mutans***

**FORTALEZA**

**2016**

**FRANCISCA JAMILA RICARTE ALEXANDRINO**

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM ROSA BENGALA EM NANOFORMULAÇÃO  
COM ALFA-CICLODEXTRINA CONTRA SUSPENSÕES DE *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ramille Araújo Lima

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A371t Alexandrino, Francisca Jamila Ricarte.  
TERAPIA FOTODINÂMICA COM ROSA BENGALA EM NANOFORMULAÇÃO COM ALFA-  
CICLODEXTRINA CONTRA SUSPENSÕES DE *Streptococcus mutans* / Francisca Jamila Ricarte  
Alexandrino. – 2016.  
32 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Coorientação: Prof. Dr. Ramille Araújo Lima.

1. Fotoquimioterapia. 2. Cárie dentária. 3. Nanotecnologia. I. Título.

CDD 616.9

---

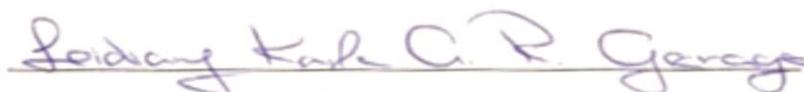
FRANCISCA JAMILA RICARTE ALEXANDRINO

TERAPIA FOTODINÂMICA COM ROSA BENGALA EM NANOFORMULAÇÃO  
COM ALFA-CICLODEXTRINA CONTRA SUSPENSÕES DE *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

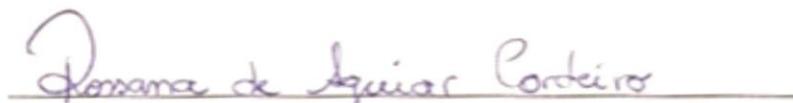
Defesa: 29/01/2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Maria Maciel Melo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua fidelidade em cada momento durante este mestrado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) na pessoa do seu Reitor Prof. Henry de Holanda Campos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) na pessoa de sua Coordenadora Prof<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, alguém com quem pude contar nos momentos difíceis, ensinando-me a não desistir das pessoas, dos obstáculos que a vida nos impõe, e que vale a pena todo sacrifício.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) na pessoa de seu Coordenador Prof. Vicente de Paulo Aragão Sabóia.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela confiança, apoio, considerações e excelente orientação. Um exemplo de dedicação e comprometimento profissional.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Ramille Araújo Lima, por ter me ajudado em cada etapa deste trabalho, inspirando-me na busca pelo conhecimento.

Ao Prof. Valder Nogueira Freire pela parceria e por suas contribuições importantes durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela parceria e confecção das nanopartículas.

As professoras participantes da banca examinadora pelas valiosas considerações e sugestões.

Aos meus professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica por terem contribuído na minha formação, expandindo horizontes e deixando a cada dia um aprendizado eterno.

À Prof<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro por ter me apresentado um laboratório quando fui sua aluna de graduação na Universidade Estadual do Ceará, plantando a semente da qual colho frutos até hoje.

À Profª Cibele Barreto Mano de Carvalho, por ter me dado a oportunidade de ser bolsista de iniciação científica por dois anos durante a minha graduação em Odontologia na UFC, no Laboratório de Bacteriologia, despertando-me para a pós-graduação na área.

À Profª Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, que me incentivou durante esse último ano de mestrado a estudar mais, emprestando-me livros; sempre positiva e com palavras de ânimo. Sua prestatividade me ajudou a ir mais longe.

Ao Prof. José Júlio Costa Sidrim, o grande Mestre, incentivador e inspirador. Suas palavras estarão para sempre guardadas em meu coração. Um professor que foi além do seu papel como orientador, e tornou-se um realizador de sonhos. Obrigada por acreditar em mim, apoiar e ensinar uma virtude que só os grandes conhecem, a humildade.

Ao meu esposo Cândido Alexandrino Barreto Neto, um homem fantástico. Meu maior incentivador e apoiador. Aquele que está ao meu lado em qualquer situação e sempre me guia no caminho certo. Essa conquista também é sua.

Ao meu filho Daniel Ricarte Alexandrino Mota, que enfrentou comigo as dificuldades inerentes de um distanciamento físico entre uma mãe e um bebê. Quando iniciei o mestrado, ele tinha um aninho e teve de ir para creche, foi doloroso nos primeiros dias ouvir seu choro ardente toda vez que saía de perto. Passamos por tantas batalhas nesses dois anos, mas nós conseguimos, meu filho. O seu sorriso me enche de esperança todas as manhãs.

Aos meus pais Ronaldo Rolim Ricarte e Francisca Aldeídes do Carmo Ricarte Rolim por todo amor e suporte necessários para que eu pudesse concluir este Mestrado. Vocês são a minha base forte. Aos meus irmãos Eva Janine Ricarte Rolim e Jamil Ricarte Rolim pela compreensão da minha ausência em alguns momentos e por cuidarem do meu filho quando foi necessário.

Aos técnicos queridos da Universidade Federal do Ceará, José Olavo Moraes (PPGMM) e David Queiroz de Freitas (PPGO) pelos muitos ensinamentos, apoio prestado e palavras de ânimo.

À secretária do PPGMM, Carolinda Vilma Soares de Oliveira, por toda atenção, cuidado e acolhimento.

Aos meus colegas de mestrado, em especial Crister José Ocadaque, Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro, Giovanna Riello Barbosa, Daniel Domingues Freitas, João Batista de Andrade Neto, Anderson Ramos da Silva, Rose Anny Costa Silva, David Caldas Vasconcelos, Samila dos

Santos Gonçalves e Francisco Eliclécio Rodrigues da Silva por estarmos juntos, dando força uns aos outros em momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório Sônia Luque Peralta, Weslanny de Andrade Moraes, Ana Catarina Martins Reis, Pedro Henrique Acioly Guedes Peixoto Vieira, Francisco Ruliglésio Rocha, Salma Ivanna Araújo Cavalcante, Wanessa Fernandes Matias Régis, Roberto Haniery Pontes Alves, Bruna Marjorie Dias Frota, Janaína Câncio de Holanda e Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa pela companhia, auxílio nos momentos necessários, boas risadas e acima de tudo pela amizade construída.

Aos meus colegas dos Programas de Pós-graduação em Física e Química da UFC: Ito Liberato Barroso Neto, Bruno Lopes de Sousa, Thiago dos Santos Francisco, Débora Hellen Almeida de Brito e Eveline Matias Bezerra por me ajudarem em análises importantes sobre o objeto de estudo, pela amizade e parceria que firmamos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos.

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele o fará”.

Salmos 37:5

## RESUMO

Considerando que a cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar-dependente e que *S. mutans* é considerado o micro-organismo mais cariogênico presente no biofilme oral, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido proposta para suprimir tal espécie cariogênica. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia da TFD, utilizando luz azul (LA) e o fotossensibilizador (FS) rosa bengala (RB) ou RB nanoparticulado com  $\alpha$ -ciclodextrina (RBNP) contra suspensões de *S. mutans*, em dois diferentes modelos de suspensão planctônica. Suspensões de *S. mutans* foram divididas em grupos, como se segue: inexistência de FS e LA, com FS e sem LA, ausência de FS com LA e presença de FS e LA. Quatro concentrações diferentes de RB e RBNP (0,031; 0,062; 1 e 2  $\mu$ M) e três densidades de energia da fonte de luz estudada (3,35; 6,70 e 10,05 J.cm<sup>-2</sup>) foram testadas. Os tratamentos foram aplicados com as bactérias suspensas em caldo triptona de soja (TSB) ou NaCl a 0,89% (Salina). Alíquotas de cada grupo estudado foram plaqueadas em ágar BHI e submetidas a contagem de unidades formadoras de colônias (CFU/mL) e os dados transformados em escala logarítmica. A LA não causou morte celular na ausência do RB ou RBNP, independente do modelo de suspensão testado. Para o RB, citotoxicidade no escuro não foi observada no modelo com TSB, enquanto que no modelo com salina, esta ocorreu na concentração de 2  $\mu$ M. Para o RBNP, houve morte celular na ausência da luz na concentração de 2  $\mu$ M no modelo com TSB, bem como com 1 e 2  $\mu$ M no modelo com salina. Nos grupos onde TFD foi utilizada, no modelo com RB e TSB, houve redução microbiana a partir da concentração 1  $\mu$ M e 3,35 J.cm<sup>-2</sup>. Nas concentrações e densidades de energia superiores não foi observado crescimento bacteriano após os tratamentos. Para o modelo com salina, houve redução microbiana a partir da concentração 0,031  $\mu$ M e 10,05 J.cm<sup>-2</sup>. Não foi observado crescimento bacteriano nas concentrações e densidades de energia superiores a 0,062  $\mu$ M com 10,05 J.cm<sup>-2</sup>. No modelo com RBNP e TSB, houve redução microbiana nas concentrações 0,031 e 0,062  $\mu$ M em todas as densidades de energia testadas. Para o modelo com salina, não foi observado crescimento bacteriano para todos os grupos onde a TFD foi realizada. O modelo de células planctônicas com salina parece apresentar menores contagens microbianas quando comparado ao modelo com TSB de modo geral. A terapia fotodinâmica realizada com RB ou RBNP foi efetiva da redução de carga microbiana em suspensões de *S. mutans*. A adição da nanopartícula favoreceu o efeito antimicrobiano do RB, contudo, mais estudos são necessários a fim de investigar os efeitos da terapia em biofilmes cariogênicos formados *in vitro* e *in situ*.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Cárie Dentária, Nanotecnologia.

## ABSTRACT

Considering that dental caries is a biofilm-sugar-dependent disease and that *S. mutans* is considered the most cariogenic microorganism present in the oral biofilm, photodynamic therapy (PDT) has been proposed to suppress cariogenic species. The aim of this study was to assess the efficacy of PDT using blue light (BL) and the photosensitizer (PS) rose bengal (RB) or RB containing nanoparticulated- $\alpha$ -cyclodextrin (RBNP) against suspensions of *S. mutans* in two different planktonic suspension models. *S. mutans* suspensions were divided into groups, as follows: absence of PS and BL, with BL and without PS, absence of PS and presence of BL and presence of BL and PS. Four different concentrations of RB and RBNP (0.031, 0.062, 1 and 2  $\mu\text{M}$ ) and three energy densities of studied light source (3.35; 6.70 and 10.05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) were tested. Treatments were applied after bacteria being suspended in tryptone soy broth (TSB) or 0.89% NaCl (saline). Aliquots of each studied group were plated in BHI agar and submitted to colony forming units counting (CFU/mL) and the data transformed into logarithmic scale. BL did not cause cell death in the absence of RB or RBNP, regardless of planktonic suspension model tested. For RB, dark cytotoxicity was not observed in TSB model, while in saline model, this cytotoxicity occurred at a 2  $\mu\text{M}$  concentration. For RBNP and TSB model, cell death occurred in the absence of light with 2  $\mu\text{M}$  concentration, as well as it occurred for 1 and 2  $\mu\text{M}$  concentrations in saline model. In groups where PDT was applied, for both RB and TSB models, microbial reduction was found from the concentration 1  $\mu\text{M}$  and 3.35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . For higher both PS concentrations and energy densities, bacterial growth was not observed after treatments. For saline model, microbial reduction occurred from 0.031  $\mu\text{M}$  concentration and 10.05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . No bacterial growth was observed in energy densities and concentrations greater than 0.062  $\mu\text{M}$  at 10.05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . In TSB model and RBNP, microbial reduction was detected for both 0.031  $\mu\text{M}$  and 0.062  $\mu\text{M}$  concentrations in all tested energy densities. For saline model, bacterial growth was not observed for all groups where PDT was performed. The model of planktonic cells with saline seems to present lower microbial counts compared to the TSB model. Photodynamic therapy performed with RB or RBNP was effective in reducing microbial load in *S. mutans* suspensions. The addition of nanoparticles favored the RB antimicrobial effect, however, further studies are needed to investigate the effects of therapy in cariogenic biofilms formed *in vitro* and *in situ*.

Keywords: Photochemotherapy, Dental Caries, Nanotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	27
Figura 2- Região do visível do espectro eletromagnético.....	28
Figura 3- Estrutura química do Rosa bengala.....	33
Figura 4- Estrutura química da alfa-ciclodextrina.....	35
Figura 5- Esquema da produção da nanopartícula de Rosa bengala e $\alpha$ -ciclodextrina.....	41
Figura 6- Desenho da placa de 96 poços utilizada no experimento.....	45
Figura 7- Desenho da placa utilizada para a irradiação.....	45
Figura 8- Desenho das placas de culturas com BHI ágar utilizadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	46
Figura 9- Aspecto morfológico do corante rosa bengala de forma livre e nanoformulação com $\alpha$ -ciclodextrina.....	47

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1- Análise do espectro do infravermelho para RB, alfa-CD e RBNP (RB $\alpha$ -CD).....	48
Gráfico 2- Redução da viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais com RB.....	52
Gráfico 3- Redução da viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais com RBNP.....	53

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

TFD- Terapia fotodinâmica

LASER- *Light amplification by stimulated emission of radiation*

LEDs- *Light emitting diodes*

FS- Fotossensibilizador

EROs- Espécies reativas de oxigênio

RB- Rosa bengala

CDs- Ciclodextrinas

RB  $\alpha$ -CD- Rosa bengala nanoparticulado com alfa-ciclodextrina

EGM- Estreptococos do grupo mutans

FEP-FTS- Fosfoenolpiruvato-fosfotransferase

PEC- Polissacarídeos extracelulares

PIC-Polissacarídeos intracelulares

GPB- Proteína ligante de glucano

GTF- Glicosiltransferase

PPM- Partes por milhão

OMS- Organização Mundial de Saúde

OH- Hidroxila

HA- Hidroxiapatita

FA- Fluorapatita

CPOD- Dentes cariados perdidos e obturados

Hp- Hematoporfirina

ALA- Ácido 5-aminolevulínico

PpIX- Protoporfirina IX

AM- Azul de metileno

TBO- Azul de orto-toluidina

NP- Nanopartículas

RBNP- Nanopartícula de Rosa bengala

ERI- Eritrosina

ATCC- *American Type Culture Collection*

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

## LISTA DE SÍMBOLOS

%- Porcentagem

/- Razão

<- Menor que

®- Marca registrada

μ- Micro

M- Molar

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>- Oxigênio Singleto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Microbioma bucal .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Cárie dentária .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2 A ingestão da sacarose e suas implicações .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Terapia Fotodinâmica.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Mecanismo de ação .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2 Fonte de Luz .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3 Fotossensibilizadores .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.4 Nanopartículas .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.5 Aplicação da terapia fotodinâmica com rosa bengala em cariologia .....</b>	<b>35</b>
<b>3 HIPÓTESES .....</b>	<b>38</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Fotossensibilizador .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Fonte de Luz .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Preparo do Inóculo.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4 Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....</b>	<b>42</b>
<b>5.5 Ensaio de determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....</b>	<b>43</b>
<b>5.6 Ensaio de determinação da viabilidade bacteriana em suspensões planctônicas... </b>	<b>43</b>
<b>5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>46</b>
<b>5.8 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IR) .....</b>	<b>46</b>
<b>5.9 Análise estatística.....</b>	<b>47</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre os micro-organismos e a cárie dentária é observada desde os primórdios do estudo da Microbiologia, quando em 1683, Antonie Van Leeuwenhoek descreveu, através do uso de uma lente de aumento, a presença de “animáculos” em um material esbranquiçado, com consistência de manteiga, encontrado sobre os seus dentes quando estes não eram limpos (LINDHE, 1992).

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar-dependente, na qual os carboidratos fermentáveis desempenham um papel fundamental na iniciação e no desenvolvimento desse processo, através do desequilíbrio entre a desmineralização e a remineralização da superfície dental (CURY; TENUTA, 2009; FEJERSKOV; KIDD, 2011; MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Nesse contexto, *S. mutans* é considerado o micro-organismo mais cariogênico presente no biofilme dentário devido a sua capacidade de utilizar carboidratos provenientes da dieta, como a sacarose, e por suas propriedades acidogênicas e acidúricas (LOESCHE, 1986), bem como pela sua capacidade de produção de polissacarídeos extra e intracelulares a partir da sacarose (BOWEN, 2002).

O controle da doença é baseado na abstenção de açúcar e em uma boa higiene oral, conseguida por meio da remoção mecânica do biofilme e da utilização de substâncias químicas (COSTA *et al.*, 2010). No entanto, o uso generalizado de agentes químicos antimicrobianos pode resultar no desenvolvimento de resistência bacteriana. Consequentemente, a descoberta de terapias com menores chances de causar este problema emergente, é valiosa (BORGES *et al.*, 2010). Neste contexto, surgiu a Terapia Fotodinâmica, (TFD), inicialmente proposta para tratamento de neoplasias, embora tenha sido descoberta por sua ação antimicrobiana. Em Odontologia, a TFD tem sido proposta para o tratamento de doenças orais com componentes microbianos, como lesões de cárie, pulpites, doença periodontal bem como infecções da mucosa e endodônticas (ZANIN *et al.*, 2006; KOMERIK; MACROBERT, 2006; ROLIM *et al.*, 2012; OLIVEIRA; AGUIAR; CAMARA, 2014).

A TFD envolve a combinação de uma luz visível, usualmente *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (LASER) ou *Light Emitting Diodes* (LEDs) e corantes fotossensíveis não-tóxicos (fotossensibilizadores) (ROLIM *et al.*, 2012; PASCHOAL *et al.*, 2014). O fotossensibilizador (FS) ativa o oxigênio molecular através da absorção da luz visível em um determinado comprimento onda, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROLIM *et al.*, 2012; GARCEZ *et al.*, 2013). Existem duas classes de espécies reativas de

oxigênio (EROs), uma produzida pela transferência de elétrons (reação tipo I) e outra, pela transferência de energia (reação tipo II). A transferência do elétron para o oxigênio molecular ( $O_2$ ) produz superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. A reação tipo II, transferência de energia para o oxigênio molecular, resulta na formação do oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (KUBLER, 2005; WILSON; PATTERSON, 2008). Uma vez que a reatividade das EROs com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a TFD. Assim, a multiplicidade de alvos dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das células microbianas (PERUSSI, 2007). Adicionalmente, esses produtos gerados na TFD são capazes de causar danos aos componentes celulares ou modificar atividades metabólicas de modo irreversível, resultando em deterioração celular (PLAETZER *et al.*, 2008). A TFD, além da morte celular, resulta em ausência de efeitos tóxicos cumulativos e não é invasiva (PERUSSI, 2007).

Os fotossensibilizadores do grupo xanteno, como rosa bengala (RB) derivado da fluoresceína, são compostos orgânicos, cíclicos que contém três anéis aromáticos em um arranjo linear e um átomo de oxigênio no centro do anel, capaz de absorver a luz na região visível do espectro de luz. Uma característica importante desse grupo é que, após sua absorção, o FS não se liga à membrana celular, podendo ser encontrado no citoplasma da célula (PERUSSI, 2007). O RB é hidrofílico e seu mecanismo fotodinâmico consiste na formação de 80% de oxigênio singleto e 20% de ânion superóxido, através da absorção da luz numa faixa compreendida entre 450-600 nm de extensão (PAULINO *et al.*, 2005; PERUSSI, 2007; ZHAO *et al.*, 2012). No entanto, devido a sua natureza hidrofílica, o RB possui fraca capacidade de penetração intracelular. Dessa forma, o uso de nanopartículas como veículo de conjugação com RB, tem demonstrado ser uma rota alternativa para melhorar a absorção do corante por células cancerosas (WANG *et al.*, 2014).

As ciclodextrinas (CDs) são moléculas cíclicas que consistem em várias unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose, sendo usualmente classificadas de acordo com o número de unidades de glicose presentes no anel; as CDs mais comuns possuem seis, sete e oito unidades, sendo denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - ciclodextrina respectivamente. Essas moléculas possuem a habilidade de formar compostos de inclusão com outras moléculas pequenas o suficiente para permanecerem contidas dentro da sua cavidade (GARCÍA *et al.*, 2012). Desse modo, propriedades como tamanho pequeno, aumento da proporção área de superfície/massa e a adição de reatividade química oferecem aos sistemas nanoparticulados características únicas, imobilizando os FS dentro de um arcabouço polimérico, evitando efeitos residuais tóxicos, ao

mesmo tempo em que permite uma estabilidade fisiológica (SHRESTHA; HAMBLIN; KISHEN, 2014).

A investigação da atividade antimicrobiana da TFD contra micro-organismos relacionados ao biofilme dental utilizando corantes fenotiazínicos, como azul de metileno e azul de orto-toluidina, foi alvo de diversos estudos anteriores (ZANIN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2013). A escolha do Rosa Bengala para este trabalho foi devido à sua capacidade de absorver comprimentos de onda em uma faixa correspondente ao comprimento de onda emitido por uma luz azul, que está presente no cotidiano da clínica odontológica. Complementarmente, o modelo de suspensão foi o eleito por se tratar do uso de um fotossensibilizador, no caso Rosa Bengala nanoparticulado com alfa-ciclodextrina, inédito em pesquisas da área.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Microbioma bucal**

O termo microbioma foi descrito inicialmente como uma comunidade ecológica de microrganismos comensal, simbiótica e patogênica que partilha o corpo e funciona como um determinante da saúde e da doença (LEDERBERG; MCCRAY, 2001). No sentido amplo desta definição, tem-se que o microbioma humano refere-se a uma enorme comunidade de microrganismos que ocupam os diversos habitats do corpo, sem o qual a compreensão da saúde e da doença humana se torna impossível (DEWHIRST *et al.*, 2010).

Dentre os sítios do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta um dos maiores índices de diversidade microbiológica, seguida pelo intestino e pela pele (COSTELLO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013). Bactérias, Archaea, fungos, vírus e protozoários fazem parte do microbioma oral, composto por mais de 700 espécies microbianas (AAS *et al.*, 2005). A variabilidade dos micro-organismos encontrados nesse sítio está diretamente relacionada com os diferentes habitats que compõem a cavidade oral, dentre eles, dentes, sulco gengival, língua, bochecha, lábio, palato duro e palato mole (DEWHIRST *et al.*, 2010).

O microbioma bucal é estável e convive em harmonia com o hospedeiro, a menos que seja perturbado por medicação, doença, como as que causam modificação no fluxo salivar, flutuações de pH (MARSH, 2003) e mudanças significativas na dieta (DAVID *et al.* 2014). A cárie dentária, uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo (PETERSEN *et al.*, 2005),

está associada a disbiose da microbiota-colonizadora e o dente, caracterizada pelo acúmulo de bactérias acidúricas e acidófilas, como *Streptococcus mutans* (TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

## 2.2 Cárie dentária

Segundo a OMS, a cárie dentária é a doença bucal mais prevalente no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública em muitos países, afetando 60-90% das crianças em idade escolar (OMS, 2014). No Brasil, segundo o último levantamento nacional realizado no ano 2010, em 177 cidades distribuídas nas cinco regiões do país, observou-se que a cárie dentária, apesar de ainda ser o principal problema de saúde bucal dos brasileiros, teve declínio em seus índices ao longo dos últimos anos (BRASIL, 2011).

Historicamente, as lesões de cárie permaneceram com uma baixa incidência até o século XIX, contudo devido à revolução industrial, desenvolveram-se produtos utilizando açúcar refinado, o que gerou um aumento na prevalência dessas lesões, tornando-se em meados do século XX, na Europa, a situação mais severa já observada da doença em populações humanas (PORTO *et al.*, 2008). A partir de então, iniciaram-se os estudos sobre a etiologia da perda dentária, e tratamentos que prolongassem a permanência dos dentes na cavidade bucal começaram a ser investigados. Assim, em 1914, Black definiu a cárie dentária da seguinte maneira:

“A cárie dentária, na sua mais simples expressão, consiste na dissolução química dos sais de cálcio do dente pelo ácido láctico, acompanhada pela decomposição da matriz orgânica, ou corpo gelatinoso, que na dentina, ocorre após a dissolução dos sais de cálcio. Na cárie de esmalte, toda a substância tecidual é removida pela dissolução de sais de cálcio, havendo tão pouca matriz orgânica no esmalte que ele não irá se manter íntegro e, conseqüentemente, uma cavidade é formada pela simples dissolução dos sais de cálcio dos quais o esmalte é composto. Esta dissolução sempre se inicia na superfície, nunca no interior. A destruição do dente é, portanto, causada por um agente atuando fora do dente, nunca dentro dele. É algo estranho ao dente, atuando na superfície no início e penetrando pouco a pouco na sua superfície.” Esta declaração enfatizou que o processo que dissolve os tecidos duros dentários ocorre como o resultado da adesão bacteriana às superfícies dentárias, particularmente nos locais de estagnação, em toda a dentição (FEJERSKOV; KIDD, 2011).

Stephan, em 1944, registrou graficamente mudanças de pH na placa, após bochechos com solução de sacarose. Posteriormente, Gustafsson *et al.*, em 1954, conduziram um estudo

em Vipeholm, na Suécia, entre 1946 e 1951, estabelecendo que quanto maior a frequência do consumo de carboidratos fermentáveis, maior a incidência de lesões de cárie. Desse modo, relacionou-se o desenvolvimento das lesões cariosas ao consumo de uma dieta rica em carboidratos.

Orland, em 1954, submeteu roedores *germ-free* (livre de micro-organismos desde o seu nascimento) a uma dieta cariogênica por 90 dias, não sendo observado nenhuma lesão de cárie. Em contrapartida, animais que recebiam a mesma dieta, mas estavam contaminados, desenvolveram cárie. A partir de então, em meados dos anos 60, após diversos estudos em animais, os estreptococos receberam mais atenção, tendo, a cárie dentária a designação de doença infecto-contagiosa (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Embora os termos doença e infecção sejam eventualmente usados como sinônimos, eles apresentam diferenças em seus significados. Infecção é a invasão ou colonização do corpo por micro-organismos patogênicos; a doença ocorre quando uma infecção resulta em qualquer mudança no estado de saúde do hospedeiro. A presença de um tipo particular de micro-organismo em uma parte do corpo onde ele normalmente não é encontrado também é chamada de infecção, podendo acarretar no surgimento de doença (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Historicamente, a primeira tentativa formal para identificação das causas de uma doença se deu com a formulação, em 1882, dos Postulados de Henle-Koch. Tais postulados satisfaziam a necessidade de se estabelecer regras que guiassem a investigação de bactérias como possíveis agentes causais. Para ser considerado como único agente causal da doença, *S. mutans* deveria obedecer a esses postulados, que podem ser resumidos da seguinte forma:

- O mesmo patógeno deve estar presente em todos os casos da doença;
- O patógeno deve ser isolado do hospedeiro doente e cultivado em cultura pura;
- O patógeno obtido da cultura pura deve causar a doença quando inoculado em um animal de laboratório suscetível e saudável;
- O patógeno deve ser isolado do animal inoculado, e deve ser necessariamente o organismo original.

Entretanto, sabe-se que os principais representantes da microbiota normal da boca são os micro-organismos dos gêneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Candida* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Logo, observa-se que *S.*

*mutans* está presente na cavidade bucal como parte da microbiota residente, não sendo encontrado somente nos casos da doença. Além disso, por ser a cárie dentária uma condição multifatorial, decorrente do acúmulo de bactérias nas superfícies dentais (biofilme) e exposição frequente a açúcares da dieta, o micro-organismo, quando inoculado sozinho em um animal, por exemplo, não será capaz de desenvolver esta condição. Portanto frente a esses fatores, lesões de cárie serão encontradas na face dental de qualquer indivíduo, desde que haja consumo frequente de carboidratos fermentáveis. A velocidade com que estas lesões se tornam visíveis clinicamente, bem como sua progressão, pode variar de indivíduo para indivíduo e de substrato dental (TENUTA; CHEDID; CURY, 2011). A etiologia microbiana da doença cárie não é o diagnóstico da enfermidade, não tendo relação de causa e efeito, portanto não obedece aos postulados de Henle-Koch (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015).

Adicionalmente a essas observações, o caráter contagioso (transmissível) não pode ser considerado, pois se assim fosse, não teria sido possível observar o declínio de cárie constatado nas últimas décadas (BRASIL, 2011), o qual não é devido a nenhuma vacina anticárie ou agente antibacteriano utilizado. Não há transmissão pessoa-a-pessoa (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Trata-se de uma condição que não é provocada por bactérias estranhas a microbiota bucal, sendo microbiologicamente não erradicável, porém controlável (TENUTA; CHEDID; CURY, 2011).

### **2.2.1 *Streptococcus mutans***

Os estreptococos podem ser classificados em  $\beta$ -hemolíticos e não  $\beta$ -hemolíticos. Os  $\beta$ -hemolíticos estão organizados em grupos de A a U (conhecidos como grupos de Lancefield), com base nas diferenças antigênicas do carboidrato C. Os não  $\beta$ -hemolíticos se caracterizam por não produzirem hemólise ou por promoverem  $\alpha$ -hemólise. Os principais micro-organismos  $\alpha$ -hemolíticos são *S. pneumoniae* e estreptococos do grupo viridans (p. ex., *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. mitis*). Estreptococos do grupo viridans são exemplos da microbiota normal da boca e da faringe humana (LEWINSON, 2014).

Clarke, em 1924, determinou o tipo de estreptococos mais comum presente nas lesões de cárie. Percebendo que os espécimes isolados se diferenciavam das demais espécies de estreptococos até então conhecidas quanto a morfologia celular e da colônia, Clarke os denominou de *S. mutans* (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006). São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos, acidogênicos e acidúricos. A fermentação de

carboidratos no metabolismo anaeróbico resulta na produção de ácidos, principalmente o ácido láctico, característica que é pré-requisito para ser considerado cariogênico, pois está relacionada com a desmineralização do esmalte dental na etapa inicial da formação da lesão de cárie (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006).

Adicionalmente, algumas características peculiares desse micro-organismo colaboram para sua patogenicidade (FEJERSKOV; KIDD, 2005; BANAS, 2004), tais como:

- Possuem muitos sistemas de transporte de açúcar, incluindo alta afinidade pelos sistemas fosfoenolpiruvato e fosfotransferase (FEP-FTS), que são capazes de rastrear açúcares, mesmo quando estes estão em baixas concentrações.
- Produzem polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC). Os PECs incluem os glucanos e frutanos, que contribuem para a formação da matriz do biofilme oral conhecido como placa dentária. Além disso, os frutanos, e um menor grau de glucanos, são instáveis e podem ser metabolizados em condições onde existam restrições na oferta de carboidratos. Os PICs são formados a partir de qualquer tipo de açúcar que possa ser convertido em glicose (incluindo lactose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como no período entre as refeições. A adesão de *S. mutans* às superfícies dos dentes pode ocorrer tanto na presença quanto na ausência de carboidratos fermentáveis. O mecanismo de aderência sacarose-dependente é mediado pela atividade enzimática das glicosiltransferases (GTFs), produtos dos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, as quais participam da síntese de polissacarídeos extracelulares, os glucanos, a partir de moléculas de sacarose (DUARTE *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2009).
- São capazes de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, tais como em pH baixo. Esta habilidade depende da manutenção de um ambiente intracelular favorável, bombeando prótons mesmo sob tais condições; presença de enzimas com pH ácido ótimo, e produção de proteínas específicas de resposta a estresse ácido.

### **2.2.2 A ingestão da sacarose e suas implicações**

Na cavidade bucal, há um volume residual de saliva após a deglutição que fica espalhado em uma fina película com cerca de 0,1 mm de espessura. Uma pequena quantidade de sacarose dissolvida nesse pequeno volume de saliva proporcionará alta concentração de sacarose,

podendo exceder o nível de saturação para o açúcar, sendo a sacarose da película salivar facilmente difundida para película da placa (FEJERSKOV; KIDD, 2005). A sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico, pois é fermentável e serve como substrato para síntese de polissacarídeos extracelulares na placa dental (BOWEN; KOO, 2011). A queda de pH induzida pela fermentação da sacarose pelas bactérias do biofilme oral proporciona uma mudança no equilíbrio da microflora da placa residente tornando-a mais cariogênica ( PAES LEME *et al.*, 2006).

### **2.3 Terapia Fotodinâmica**

A utilização da luz como uma terapia em Medicina é registrada desde a antiguidade nas civilizações da Grécia, Egito e Índia. No entanto, a fototerapia desapareceu por um longo tempo, sendo redescoberta pela civilização ocidental no início do século XX (DENIELL; HILL, 1991). A primeira demonstração de fotossensibilização letal de células data de 1900, quando Raab verificou que baixas concentrações de acridina, no escuro, não possuíam efeito sobre o *Paramecium*, porém podiam, sob exposição à luz normal do dia, determinar a inativação do micro-organismo (KESSEL, 2004). O uso da terapia fotodinâmica contemporânea foi relatada primeiramente pelo médico dinamarquês Niels Finsen no tratamento de uma condição da pele tuberculosa conhecido como o lúpus vulgar (DENIELL; HILL, 1991). Em Odontologia, a aplicabilidade da TFD se expandiu rapidamente, representando uma alternativa ao tratamento do câncer de boca, das infecções bacterianas, fúngicas e virais, além de auxiliar no diagnóstico de transformações malignas da cavidade oral (RAJESH *et al.*, 2011).

A terapia fotodinâmica consiste de uma modalidade de tratamento não-invasiva, que emergiu como alternativa ao tratamento das infecções microbianas com antibióticos, sendo caracterizada por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem após ativação de um fotossensibilizador por uma fonte de luz em um comprimento de onda complementar na presença de oxigênio molecular, gerando espécies reativas citotóxicas de oxigênio que podem causar danos nas células alvo (WILSON; PATTERSON, 2008; TAVARES; CARVALHO; FAUSTINO, 2010; RAJESH *et al.*, 2011). Ocorre que durante a irradiação, o fotossensibilizador sofre uma transição de um estado de baixa energia para um estado de alta energia, produzindo essas espécies citotóxicas, proporcionando uma rápida e seletiva destruição no tecido-alvo (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

A absorção seletiva dos fotossensibilizadores em camadas específicas de tecidos; a

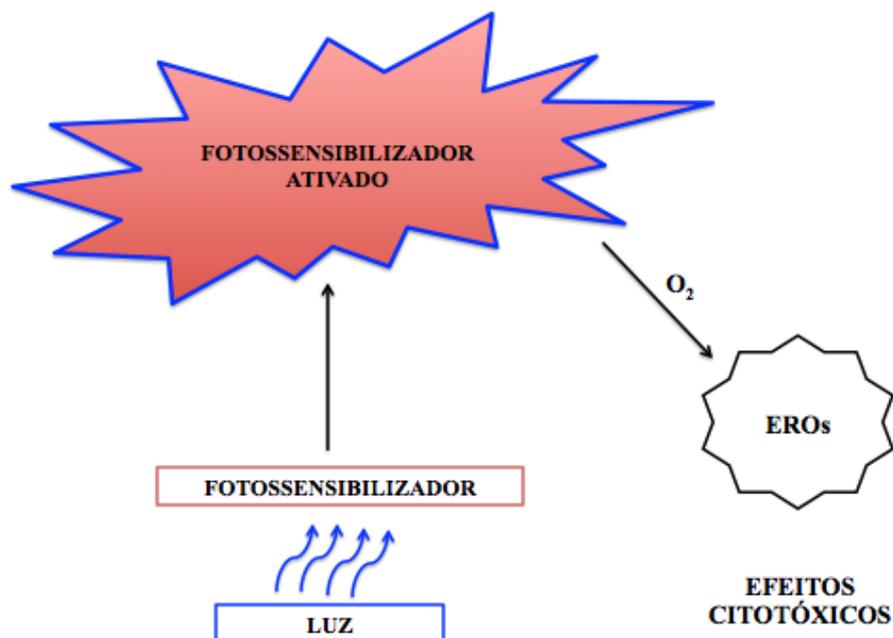
direção precisa da luz, com o uso de laser e fibra ótica; a menor possibilidade de formação de cicatrizes pela localização da droga e luz nas células em proliferação; sua realização em doses repetidas, sem a necessidade de limitação de doses totais e a inexistência de relatos do surgimento de resistência a tratamentos realizados repetidamente, são vantagens citadas para a TFD. (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Contudo, a TFD requer o direcionamento da luz para o local adequado, muitas vezes, necessitando da colaboração e coordenação entre os envolvidos no tratamento. Além disso, o tempo de duração da sessão clínica pode se tornar bastante prolongado devido aos passos inerentes à realização da terapia (GURSOY *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Mecanismo de ação

Durante a irradiação, o fotossensibilizador sofre transição de um estado de baixa energia ou estado fundamental para um estado de alta energia ou estado tripleto, produzindo espécies reativas de oxigênio, proporcionando uma rápida e seletiva destruição do tecido-alvo (Fig. 1). Existem dois mecanismos pelos quais os estados tripletos dos fotossensibilizadores podem reagir com as biomoléculas. O mecanismo tipo I envolve a transferência de elétrons/hidrogênio diretamente a partir do fotossensibilizador, produzindo íons ou remoção de elétrons/hidrogênio a partir de uma molécula de substrato para formar radicais livres. Estes radicais reagem com o oxigênio, resultando na produção de espécies altamente reativas, como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. O tipo II consiste na transferência de energia, que ocorre quando o FS irradiado com a luz absorve um fóton e com isso um dos seus elétrons passa para o orbital energeticamente mais alto, mas de mesmo spin, resultando em um estado excitado singleto, conhecido como oxigênio singleto (LAKOWICZ, 1999; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Tais EROs podem causar oxidação dos constituintes celulares, como a membrana plasmática e o ácido desorribonucleico (DNA), levando à morte da célula. Além disso, essas espécies citotóxicas podem danificar diretamente a membrana citoplasmática, inativando o sistema de transporte de membrana, inibindo a atividade enzimática da membrana plasmática, causando oxidação lipídica, dentre outros danos (TAKASAKI; AOKI; MIZUTANI, 2009).

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.



Fonte própria. Luz (fotóns) de uma energia apropriada é absorvida por um fotossensibilizador, que sofre uma transição de um estado fundamental de baixa energia para um estado altamente excitado. O fotossensibilizador ativado interage com o oxigênio para produzir oxigênio singleto e outras espécies reativas que causam um efeito tóxico nas células dos micro-organismos, por exemplo.

As células morrem de dois modos. O primeiro tipo de morte celular, a necrose, ocorre quando as células são danificadas por toxinas ou privadas de oxigênio ou nutrientes essenciais. Essas células normalmente incham e se rompem, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Mais comumente, a morte celular é devido à apoptose, configurando uma série de eventos geneticamente programados, devido à fatores como o envelhecimento celular, a ausência de sinal mitótico e o reconhecimento do DNA danificado (SAVADA *et al.*, 2009). Como consequência de TFD, as células podem morrer por necrose ou apoptose (NYMAN; HYNNINEN, 2004). A necrose é uma morte celular degenerativa que resulta de extensos danos celulares. Apoptose é um mecanismo de morte geneticamente programada de células velhas em ambas as condições fisiológicas e patológicas de um organismo vivo. Diferentemente da necrose, os restos da célula são eliminados de uma forma organizada, sem inflamação extensa (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

### 2.3.2 Fonte de luz

A eficácia da TFD é dependente de vários fatores relacionados à fonte de luz, tais como o comprimento de onda e sua interação com o FS, a potência de saída do aparelho, o tempo de irradiação, o diâmetro do feixe, o modo de funcionamento da fonte de luz, se contínuo ou

pulsado e a convergência do feixe se focada ou desfocada (WILSON, 1993; PLAETZER *et al.*, 2003).

Todas as fontes luminosas comuns emitem luz de muitos comprimentos de onda diferentes. A luz branca contém todos os comprimentos de onda, ou a maioria das cores do espectro visível (Fig. 2). A luz colorida normal, tal como a emitida por lâmpadas de cor, é constituída por uma ampla gama de comprimentos de onda que correspondem a uma parte específica do espectro de luz visível (FREITAS; SIMÕES, 2015).

Figura 2: Região do visível do espectro eletromagnético.



Fonte própria.

A terapia fotodinâmica requer uma fonte de luz que ative o FS pela exposição à baixa potência de luz visível em um comprimento de onda específico (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Inicialmente, a ativação do FS era realizada por diversas fontes de luz, principalmente com fontes LASER. O LASER é uma luz monocromática, coerente (contínua e sincronizada), e o seu feixe aponta em uma única direção (colimado), obtendo-se assim características peculiares com seu uso. Entretanto, equipamentos com laser utilizam-se de sistemas complexos e caros (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; FREITAS; SIMÕES, 2015). Desse modo, busca-se desenvolver sistemas mais compactos e vantajosos economicamente, tais como os LEDs, que foram utilizados pela primeira vez como um componente eletrônico na década de 1960. Posteriormente, com o desenvolvimento de sistemas eletrônicos e dos materiais, foi possível utilizar LEDs como fontes de luz eficientes (FREITAS; SIMÕES, 2015). Trata-se de uma luz que não é coerente nem colimada, contudo pode ser muito mais monocromática que outras fontes de luz. Em contraste com os lasers, os LEDs consomem uma menor quantidade de energia para produzir luz, e com um baixo componente térmico, são duráveis e, dependendo do comprimento de onda desejado, podem ser mais baratos e facilmente obtidos (FREITAS; SIMÕES, 2015). Sendo, portanto uma fonte de luz alternativa ao uso dos lasers, os LEDs, que

já estão presente na rotina odontológica, estão sendo utilizados na TFD, não necessitando da aquisição de equipamentos para o único fim de realização de TFD (SANTIN *et al.*, 2014).

A fonte de luz ideal para TFD deve estar situada na porção visível do espectro eletromagnético da luz e comprimento de onda específico de ressonância para tingir. O comprimento de onda depende da dose e da profundidade da ação do fotossensibilizador utilizado (SANTIN *et al.*, 2014).

As fontes de luz vermelha com comprimento de onda entre 630 e 700 nm têm sido amplamente utilizadas em TFD, seus comprimentos de onda relativamente longos, podem efetivamente penetrar nos tecidos biológicos (WILSON, 1986). Pesquisas prévias têm demonstrado que a interação entre essas fontes de luz e os FS que absorvem neste comprimento de onda, tais como o azul de metileno, azul de toluidina orto e verde malaquita, pode resultar em morte microbiana significativa de bactérias cariogênicas (ROLIM *et al.*, 2012). Adicionalmente, a luz azul (380-520 nm) é um atrativo opção para TFD, pois tais fontes de luz podem ser utilizadas em combinação com outros FS, como o rosa bengala, eosina e eritrosina, para a fotoinativação de micro-organismos orais (COSTA *et al.*, 2010; ROLIM *et al.*, 2012).

### 2.3.3 Fotossensibilizadores

Um fotossensibilizador ideal deve ser não tóxico e exibir toxicidade local apenas após ativação por iluminação (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Além disso, segundo Alisson *et al.* (2004), algumas propriedades específicas são necessárias para que possa ser utilizado como fotossensibilizador:

- ✓ Características fotofísicas favoráveis;
- ✓ Ser quimicamente puro e ter composição constante e conhecida, pois compostos puros simplificam a interpretação da relação dose-resposta;
- ✓ Ter mínima toxicidade no escuro, não ser mutagênico nem carcinogênico;
- ✓ Acúmulo preferencial na célula tumoral (seletividade), evitando assim efeitos colaterais;
- ✓ Ser rapidamente eliminado do organismo induzindo assim uma baixa toxicidade sistêmica (farmacocinética favorável);
- ✓ Ser solúvel em água ou em solvente inofensivo e não apresentar agregação em meio biológico, pois isto reduz a eficiência fotodinâmica;
- ✓ Não provocar dor durante e após o tratamento, já que TFD geralmente não requer

anestesia ou sedação pesada;

- ✓ Facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutividade e custos reduzidos.

Perussi (2007) classificou os principais FS utilizados atualmente na TFD nos seguintes grupos:

- **Porfirinas**

Os fotossensibilizadores mais utilizados na TFD no tratamento de cânceres são os derivados da hematoporfirina (Hp), sendo Photofrin® (Canadá) o mais conhecido. Seu uso clínico foi autorizado em 1998 nos Estados Unidos, seguido por Canadá, Holanda, França, Alemanha e Japão. Os fotossensibilizadores correspondentes produzidos na Alemanha e Rússia são, respectivamente, Photosan® e Photogem®. Ambos apresentam características químicas, fotofísicas e de diagnóstico bem como características terapêuticas semelhantes, porém não idênticas ao Photofrin®. Esses três fotossensibilizadores são de primeira geração e consistem da mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina (HpD).

- **Clorinas**

As clorinas são porfirinas reduzidas pela hidrogenação de uma ou mais duplas ligações dos anéis pirrólicos. A clorina  $e_6$  é uma forma derivada da clorofila  $a$  que apresenta duas importantes propriedades: maior rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e intensa banda de absorção em comprimentos de onda maiores (650-660 nm) que as porfirinas (610-630 nm). Exemplos: Photodithazine (Rússia) e Foscan (Alemanha).

- **Ácido 5-aminolevulínico**

Um pró-fármaco, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), serve como um precursor do fotossensibilizador, protoporfirina IX (PpIX). Esse mecanismo é baseado na acumulação endógena do FS PpIX, pois a administração exógena de ALA inibe o primeiro passo da síntese de porfirina, o que resulta na acumulação de PpIX no tecido (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Devido à limitação da profundidade do ALA quando administrado topicamente, seu uso é restrito a lesões superficiais (1- 2 mm). ALA é rapidamente eliminada dos tecidos do corpo e no prazo de 48 horas, e a fotossensibilidade da pele dura menos de 24 horas.

- **Ftalocianinas**

As ftalocianinas são consideradas como sendo derivadas de porfirinas, porém seu caráter aromático superior explica a absorção mais intensa desses compostos na região próxima do infravermelho comparada àquela dos núcleos de porfirina originais. Fornecem uma larga gama de compostos em termos do átomo central de metal/semimetal (Al, Ga, Si, Zn) e

funcionalidade da cadeia lateral. Como FS, as ftalocianinas fornecem alto rendimento de produção de oxigênio singleto. Esses compostos mostram grande potencial na área de desinfecção dos produtos derivados de sangue.

- **Fenotiazínicos**

Os corantes fenotiazínicos são moléculas catiônicas com estrutura fundamental composta por um sistema de anel aromático tricíclico planar, que constitui um sistema altamente conjugado, funcionando como o cromóforo destes compostos (HARRIS *et al.*, 2004). Exibem intensa absorção na faixa compreendida entre 600- 660 nm, região do espectro útil em TFD por estar na “janela terapêutica” ou “janela óptica” ( intervalo de comprimentos de ondas situado entre os 650 e 1300 nm) requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos, assim como considerável rendimento quântico de oxigênio singleto (HARRIS *et al.*, 2004). Exemplos: azul de metileno (AM), azul de orto-toluidina (TBO).

- **Riboflavina**

Vitamina B2, ou riboflavina, essencial na dieta humana, é um agente comprovadamente não tóxico que pode ser usado na fotodesinfecção dos produtos do sangue, uma vez que nesse processo as principais preocupações são os prováveis efeitos colaterais nos receptores do sangue. Embora esse tipo de estudo esteja apenas em sua fase inicial, sabe-se que riboflavina é ativa em cada um dos principais componentes do sangue sem dano significativo a essas estruturas.

- **Hipericina**

A hipericina é um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família *Guttiferae*. Sua indicação é apropriada em quadros de distúrbios psicovegetativos, estados depressivos leves e moderados, medo e/ou agitação emocional. Adicionalmente, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina os hematomas. O composto exibe uma potente atividade fototóxica antitumor *in vitro* e *in vivo*. Hipericina é provavelmente o mais potente FS encontrado na natureza. Atualmente, a hipericina produzida sinteticamente tem sido estudada como uma nova geração de fármacos para utilização em TFD e alguns resultados indicam que este FS pode induzir tanto a apoptose quanto a necrose de células tumorais (AGOSTINIS *et al.*, 2002).

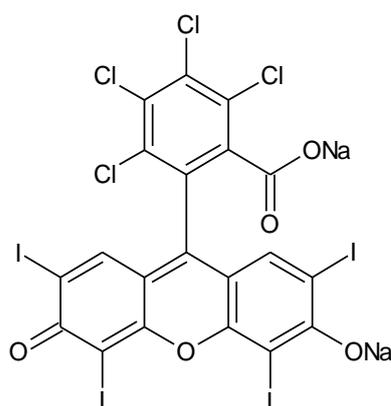
- **Xantenos**

Xantenos são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível. Alguns exemplos de xantenos são Rosa Bengala, Eosina Y, Fluoresceína e Eritrosina B.

Rosa Bengala (Fig. 3) é um haleto derivado da fluoresceína, cujo uso tem sido bastante relatado como um corante para diagnóstico de várias doenças externas ao olho, além do tratamento de câncer (JERJES; HAMDOON; HOPPER, 2012; WANG *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Como um FS, Rosa Bengala pode matar micro-organismos, tais como vírus, bactérias e protozoários. Em um ambiente aquoso contendo nucleotídeos, o mecanismo fotodinâmico da Rosa Bengala sob irradiação em torno de 532 nm é predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singleto e os restantes 20% de ânions superóxidos (PAULINO *et al.*, 2005; SUGITA *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2008). O oxigênio singleto é um oxidante poderoso que pode reagir com muitos tipos de biomoléculas. Estas incluem gliceróis, colesteróis, fosfolípidos, aminoácidos, tais como triptofano, histidina e metionina; bem como bases de ácidos nucleicos, como guanina e guanosina (NYMAN; HYNNINEN, 2004). O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  num ambiente celular é curto por ser altamente reativo. Logo, reage no seu local de formação. Isto também significa que as moléculas do fotossensibilizador não ligadas a células não são fototóxicas (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

No entanto, a aplicação clínica do Rosa Bengala tem sido limitada, pois ao ser administrado de maneira sistêmica é rapidamente acumulado no fígado e excretado antes que possa se acumular no tecido tumoral (SUGITA *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2008). Por não absorverem a luz em um comprimento de onda adequado para máxima penetração desta nos tecidos, estes corantes são mais indicados para o tratamento de lesões superficiais (UESUGI; FURUMIYA; MIZUTANI, 2006). Adicionalmente, a tendência deste corante aniônico de se agregar em concentrações elevadas restringe o uso generalizado de RB em solução, pois a formação de agregados diminui a sua resposta fotoquímica (FINI *et al.*, 2007). A agregação é particularmente importante em solução salina; é bem conhecido que a concentração máxima em que RB pode ser considerado como monômero diminui significativamente com a adição de sal. Uma estratégia para evitar a autoagregação do corante pode ser a sua introdução nos sistemas de nanopartículas, aumentando sua eficiência e protegendo contra possíveis processos de fotoxidação (FINI *et al.*, 2007).

Figura 3: Estrutura química do Rosa bengala.



**Rosa bengala**

Fonte própria.

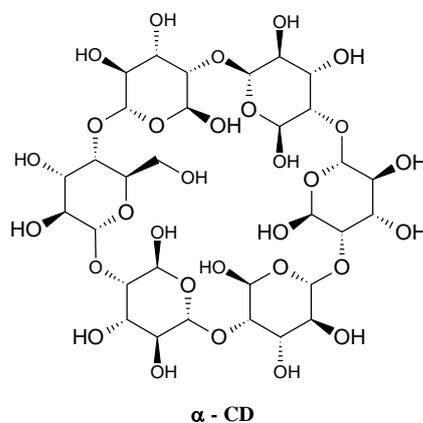
### 2.3.4 Nanopartículas

Materiais nanoparticulados incluem formas esféricas, cúbicas, partículas nanométricas em forma de agulha, e os dispositivos quase nanométricos (micrométricos) (ALLAKER, 2010). Algumas nanopartículas (NPs) constituem um tipo de sistema de entrega de fármaco coloidal compreendendo partículas com um intervalo de tamanho entre 10 a 1000 nm de diâmetro (MUDSHINGE *et al.*, 2011). As principais vantagens das NPs são a biodisponibilidade melhorada, facilitando a solubilidade; o aumento do tempo de resistência no corpo e a seletividade pelo local de ação. Isto resulta numa redução concomitante na quantidade de fármaco necessária, diminuindo a toxicidade e a dosagem, possibilitando a entrega segura de drogas terapêuticas e tóxicas (MUDSHINGE *et al.*, 2011). Para desenvolver um sistema de nanopartículas eficiente, tanto a liberação do fármaco quanto a biodegradação de polímeros são importantes fatores a serem considerados. Em geral, a taxa de liberação da droga depende da sua solubilidade, da dessorção da superfície ligada/adsorção da droga, da difusão da droga através da matriz de nanopartículas, da erosão da matriz de nanopartículas/ degradação e da combinação dos processos de erosão e difusão (MUDSHINGE *et al.*, 2011).

Atualmente, muitas plataformas estão disponíveis para prolongar ou retardar a liberação de fármacos altamente solúveis em água (SALÚSTIO *et al.*, 2011). Nesse contexto, as ciclodextrinas (CDs), produtos naturais da degradação do amido, vêm ganhando espaço. O interesse da encapsulação de medicamentos, como os antibióticos penicilina e amoxicilina pela indústria farmacêutica, ocorreu a partir da complexação do princípio ativo  $\beta$ -lactama com CDs (RAWAT *et al.*, 2004), pois este era pouco solúvel em água, quimicamente instável e

apresentava sabor desagradável. Todas essas características indesejáveis foram amenizadas após a incorporação desses compostos em CDs. Elas são oligossacarídeos cíclicos construídos a partir de unidades de glucopiranosose ligadas por ligações  $\alpha$ -1,4. Caracterizam-se por serem substâncias cristalinas, homogêneas, e não higroscópicas. As CDs naturais são  $\alpha$ -CD (Fig. 4), que compreende seis unidades de glucopiranosose, a  $\beta$ -CD que compreende sete dessas unidades, e a  $\gamma$ -CD que compreende oito unidades de glucopiranosose (WENZ; HAN; MÜLLER, 2006). As CDs apresentam um grande potencial em aplicações industriais pois, devido ao seu arranjo tridimensional, suas moléculas apresentam um espaço (cavidade) interno apolar. Esse espaço no interior da molécula permite que elas formem complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos, modificando suas propriedades físicas e químicas. As CDs estão sendo utilizados como potenciadores de permeação em formulações tópicas e para aumentar a permeabilidade de fármacos insolúveis em água, fazendo a droga disponível na superfície da membrana biológica (pele, mucosa, ou a córnea do olho) (SALÚSTIO *et al.*, 2011). Para drogas solúveis em água, as CDs aumentam a permeabilidade da droga através de uma ação direta na membrana e melhoram a absorção da droga e/ou sua biodisponibilidade (SALÚSTIO *et al.*, 2011). Adicionalmente, pelo fato de conferirem maior estabilidade físico-química de componentes susceptíveis à ação da luz e reduzirem a velocidade da oxidação dos compostos, as CDs tornam-se um veículo interessante para investigação em TFD.

Figura 4: Estrutura química da alfa-ciclodextrina.



Fonte própria.

### 2.3.5 Aplicação da terapia fotodinâmica com rosa bengala em cariologia

Foi previamente demonstrada a eficácia da TFD utilizando RB e um aparelho fotopolimerizador contra culturas planctônicas de *S. mutans* (PAULINO *et al.*, 2005). Os fotopolimerizadores são equipamentos extremamente comuns em consultórios odontológicos, sendo responsáveis pela polimerização de materiais resinosos usados frequentemente em restaurações dentárias. A utilização destes equipamentos como uma fonte de luz para a inativação de bactérias após o tratamento com Rosa Bengala pode significar a diminuição de custos para a implementação de mais uma modalidade de tratamento odontológico. Neste estudo, o corante mostrou toxicidade no escuro, apenas em concentrações elevadas (acima 5,0  $\mu\text{M/L}$ ), o que é normalmente encontrado nas drogas fotossensíveis exógenas.

Outra fonte de luz bastante utilizadas em consultórios odontológicos são os LEDs, que também já foram associados com eritrosina e RB, para inativação de culturas planctônicas de *S. mutans* (ATCC 35688) contendo  $10^6$  células/mL (COSTA *et al.*, 2010). Ambos os corantes foram preparados na concentração 2  $\mu\text{M}$  e irradiados com um LED ( $95 \text{ J.cm}^{-2}$ ), de comprimento de onda situado na faixa de 440-460 nm, por 180 s. A terapia fotodinâmica com RB e eritrosina exerceu um efeito antimicrobiano em todas as estirpes *S. mutans* estudadas.

A atividade bactericida contra *S. mutans* foi demonstrada ser maior com o uso de RB quando comparada àquelas usando eritrosina e floxina (ISHIYAMA *et al.*, 2012). No entanto a capacidade de produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e dose de energia de  $80 \text{ mW.cm}^{-2}$  foi maior para a floxina, seguidas de produções similares entre RB e eritrosina. Desta forma, outros fatores além da produção de  $^1\text{O}_2$  devem estar envolvidos na atividade antibacteriana, como a taxa de incorporação do corante na célula bacteriana, que foi maior para o RB quando comparado aos outros corantes testados.

Ainda contra *S. mutans* e utilizando aparelho fotopolimerizador associado ao RB, a atividade antimicrobiana da TFD foi testada e comparada a de diferentes fotossensibilizadores, tais como azul de metileno, azul de orto-toluidina, verde malaquita, eosina e eritrosina, todos na concentração de 163,5  $\mu\text{M}$ , e respectivas fontes de luz operando com  $24 \text{ J.cm}^{-2}$ . A geração de oxigênio singlete foi avaliada pela fotooxidação do triptofano. Todos os fotossensibilizadores foram capazes de reduzir a luminescência do triptofano quando irradiados com comprimentos de onda adequados, exceto verde malaquita. Os experimentos *in vitro* com *S. mutans* demonstraram que o azul de orto-toluidina foi o único FS que reduziu 99,9% dos

micro-organismos. A toxicidade na ausência de luz gerada por RB e ERI não permitiu uma comparação acurada entre os demais fotossensibilizadores (ROLIM *et al.*, 2012).

Mais recentemente, a ação da TFD *in vitro* em biofilme de *S. mutans* (ATCC35688) e *S. sanguinis* (ATCC10556), utilizando eritrosina e RB, ambos nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  foi testada e demonstrada (PEREIRA *et al.*, 2013). Um LED (95  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), de comprimento de onda na faixa correspondente a 455-475 nm foi usado por 180 s. O estudo mostrou que a TFD, utilizando ERI e RB, tem se mostrado mais efetiva em culturas planctônicas de *S. mutans*, apesar de terem obtido redução no número de CFU/mL nos biofilmes testados.

O primeiro relato de associação de RB com nanopartículas, em TFD, foi previamente descrito, e relata que o corante foi conjugado com nanopartículas de quitosana contra biofilmes de *E. faecalis* (SHRESTHA *et al.* 2014). A quitosana proporcionou um ganho na atividade antimicrobiana da TFD, além de proporcionar uma estabilização na matriz de colágeno da dentina (componente importante da estrutura dentária). O aumento da eficácia antimicrobiana foi atribuído ao efeito sinérgico das nanopartículas de quitosana bioativas policatiônicas e à fração de oxigênio singlete produzida pelo fotossensibilizador após fotoativação. Adicionalmente, essa incorporação de RB pela quitosana diminuiu a toxicidade do FS no escuro. A concentração de RB utilizada no biofilme de *E. faecalis* foi de 10  $\mu\text{M}$  e as concentrações da nanopartícula de RB e quitosana foram de 0,1 e 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As doses de energia aplicadas foram 20  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 40  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  e 60  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . A morte das células do biofilme maduro foi atingida na concentração de 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para nanopartícula e de 10  $\mu\text{M}$  para RB, na dose de energia 60  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Portanto, mais estudos são necessários acerca da atividade antimicrobiana do Rosa bengala puro ou melhorado por nanotecnologia a fim de elucidar a melhor concentração e tempo de irradiação necessários para uma inativação microbiana eficiente.

### 3 HIPÓTESES

- A adição de  $\alpha$ -CD nanoparticulada ao FS rosa bengala aumenta a eficácia de seu efeito inibitório quando irradiado por uma luz azul propiciando diminuição da concentração do RB e densidade de energia da fonte de luz utilizada.
- Adicionalmente, o modelo de suspensão de células plactônicas em solução de NaCl 0,89% (salina) propicia uma maior eficiência antimicrobiana da TFD, uma vez que não haverá interência entre a cor do FS e o meio de cultura usado, no caso TSB, bem como não haverá barreira ótica para a passagem da luz pela inexistência da coloração presente no meio de cultura.

## 4 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia do sistema de nanopartículas de rosa bengala e  $\alpha$ -ciclodextrina na atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica contra às suspensões de *S. mutans* em dois diferentes meios de suspensão planctônicas.

### 4.1 Objetivos específicos

- Caracterização morfológica da nanopartícula e da eficiência do encapsulamento de RB pela  $\alpha$ -CD;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do rosa bengala, da  $\alpha$ -ciclodextrina e da nanoformulação frente a culturas planctônicas de *S. mutans*;
- Testar a eficácia da Terapia fotodinâmica com diferentes concentrações de RB e RBNP e tempos de irradiação, utilizando um LED azul;

- Investigar a ação dos ensaios de suspensão com Terapia fotodinâmica, avaliando um modelo de suspensão planctônica em solução salina (NaCl a 0,89%) e em caldo triptona de soja (TSB).

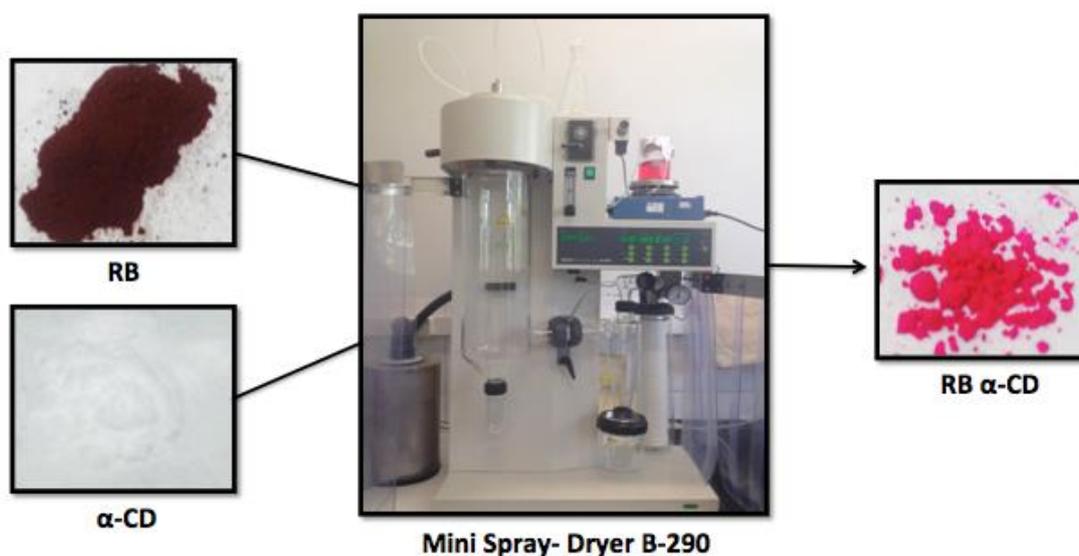
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Fotossensibilizador

Os fotossensibilizadores utilizados nesse experimento foram o Rosa bengala (RB) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) e Rosa bengala nanoparticulado com  $\alpha$ - ciclodextrina (RBNP). RB na formulação pó foi solubilizado em solução salina (0,89% NaCl) de modo a atingir as concentrações testadas especificadas adiante. A partir da massa molecular (MM) do Rosa bengala (1017,64 g/mol), determinou-se a quantidade necessária de massa (gramas) necessárias para atingir a concentração de partida desejada. Sabendo-se que a molaridade corresponde ao número de mols (n) pelo volume (L), calculou-se, posteriormente, a quantidade referente a 5 mL (volume final). Utilizando-se a fórmula química de diluição das soluções ( $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ ), chegou-se a quantidade necessária do volume inicial que precisava ser retirado da solução preparada para completar com solução salina estéril a fim de atingir os 5 mL desejados. A preparação foi filtrada através de um filtro descartável para seringa com

membrana microporosa 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore Corporation, São Paulo, Brasil) e estocada em tubos Falcon. Após a filtração, os fotossensibilizadores permaneceram ao abrigo da luz. A nanopartícula, RBNP, foi preparada utilizando um mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Switzerland) (Fig. 5) no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais em parceria com a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica-UFC). As aberturas de entrada e de saída de ar foram mantidas a 130°C e 65°C respectivamente, com fluxo de alimentação de 3,5 mL / min, um volume de aspiração de 35 m<sup>3</sup>/h, e um volume de ar de 84 L/h. Neste processo de encapsulamento, a formulação utilizada correspondeu a massa de  $\alpha$ -ciclodextrina (1,0 g) dissolvida em 200 mL de água destilada e suavemente agitada durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, 100 mg de RB foram adicionados à solução, que foi agitada durante a noite. Em seguida, a solução foi dispensada no mini Spray Dryer, obtendo-se a nanopartícula por meio de secagem por aspersão dessa solução (Fig. 5).

Figura 5: Imagens do aparelho. mini Spray Dryer B-290 e dos compostos envolvidos na produção da nanopartícula.



Fonte própria.

## 5.2 Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada foi um diodo emissor de luz (LED) Ultrablue plus ( $\lambda=520$  nm, DMC, São Carlos, SP, Brasil). O fotossensibilizador apresenta pico de absorção máxima em torno de 520 nm. As densidades de energia utilizadas foram  $3,35 \text{ J.cm}^{-2}$ ,  $6,70 \text{ J.cm}^{-2}$  e  $10,05 \text{ J.cm}^{-2}$ , correspondendo a 60s, 120s e 180s de irradiação, respectivamente. Para calcular a densidade de energia ou exposição radiante utilizou-se a fórmula:

$$D (\text{J/cm}^2) = E (\text{J}) / A (\text{cm}^2) \quad \text{e} \quad E (\text{J}) = P (\text{W}) \times t (\text{s})$$

Onde: D = densidade de energia; P= potência; t= tempo de irradiação e A= área.

A potência de saída do aparelho é de 43 mW. O local irradiado corresponde ao poço de uma placa de cultura de células de 96 poços (Techno Plastic Products, TPP®, Switzerland), cuja área é  $0,7693 \text{ cm}^2$ . A distância entre a fonte de luz e o local da irradiação foi 3 mm. O tempo de pré-irradiação, para todos os grupos, foi de 5min.

## 5.3 Preparo do inóculo

Uma suspensão padronizada de *S. mutans* UA 159 (ATCC 700610), cepa já utilizada em pesquisas anteriores (ROLIM *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2015), contendo  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), foi preparada para captação do micro-organismo. Primeiramente, o Caldo Triptona de Soja (TSB, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA) enriquecido com extrato de levedura 0,5% (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA) e glicose 1% (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi inoculado com *S. mutans* e, em seguida, incubado por 18 horas em  $37^\circ \text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (Thermo Fischer Scientific, Model 311, OH 45750, Marietta, Ohio, USA).

Em seguida, a suspensão foi ajustada para  $1-2 \times 10^6$  UFC/mL, conforme orienta a norma do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). O ajuste foi realizado utilizando dois modelos de células planctônicas: com as células bacterianas suspensas em meio de cultura (TSB) ou em solução salina (0,89% NaCl). Neste último caso, a suspensão foi centrifugada a 3000 g por 5 min em  $25^\circ \text{C}$  (Centrífuga Refrigerada, NT 815, NOVATÉCNICA, Piracicaba, SP, Brasil), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado resuspendido em 5 mL de solução salina estéril.

#### 5.4 Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Uma vez que não existe um consenso na literatura acerca da concentração inibitória e bactericida mínimas (CIM e CBM, respectivamente) da terapia fotodinâmica realizada com o fotossensibilizador Rosa Bengala para *S. mutans*, ensaios para determinação da CIM e CBM do Rosa bengala (RB) em forma livre e em nanoformulação (RBNP) foram realizados.

A técnica de microdiluição em caldo foi realizada conforme recomendações do CLSI (2012). Inicialmente, o inóculo de *S. mutans* foi padronizado em meio TSB com extrato de levedura a 5% na escala 0,5 de McFarland. Para este ensaio foram utilizadas as concentrações iniciais de 32  $\mu\text{M}$  de RB e 64  $\mu\text{M}$  de RBNP como soluções-estoques e 11 diluições binárias de cada fotossensibilizador foram testadas. Foi adicionado a cada poço da placa de 96 poços: 100  $\mu\text{L}$  de caldo, 100  $\mu\text{L}$  de RB ou RBNP em concentrações variadas e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo.

Além dos grupos experimentais acima citados, para ambos os ensaios de CIM (RB e RBNP) foram realizados os seguintes grupos para controle:

- Controle de turvação: 100  $\mu\text{L}$  do fotossensibilizador [RB ou RBNP + 110  $\mu\text{L}$  de caldo TSB (sem inóculo)]
- Controle de negativo 1 : 100  $\mu\text{L}$  de Solução Salina 0,89% + 100  $\mu\text{L}$  de caldo TSB + 10  $\mu\text{L}$  do inóculo
- Controle de negativo 2 : 100  $\mu\text{L}$  de Solução Salina 0,89% + 100  $\mu\text{L}$  de caldo TSB + 10  $\mu\text{L}$  do inóculo + Irradiação com LED (180 s)
- Controle positivo: 100  $\mu\text{L}$  de Digluconato de Clorexidina 0,12% (CHX) + 100  $\mu\text{L}$  de caldo + 10  $\mu\text{L}$  do inóculo
- Controle de esterilidade: 210  $\mu\text{L}$  de caldo TSB
- Controle do inóculo: 200  $\mu\text{L}$  de caldo TSB + 10  $\mu\text{L}$  do inóculo inicial

As microplacas foram incubadas em 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do fotossensibilizador (RB ou RBNP) capaz de inibir o crescimento de *S. mutans*, constatado mediante inspeção a olho nu (ausência de turvação visível) e leitura da absorbância de 492 nm (Thermoplate, TP-READER-BASIC NEW, CHINA).

### 5.5 Ensaio de determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram selecionados os poços que apresentaram inibição visível do crescimento bacteriano no ensaio da CIM. Para isso, 25  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços foram subcultivados em placas contendo Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar- Difco laboratories, Detroit, MI, EUA) estéril, produzido de acordo com as recomendações do fabricante (52 g de BHI para 1000 mL de água destilada); e incubados durante 48 horas em 37 °C em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, as culturas foram analisadas para verificação visual do crescimento bacteriano. A CBM foi definida como a concentração mínima dos fotossensibilizadores RB e RBNP, com e sem ativação por luz, necessárias para matar a maioria ( $\geq 99,9\%$ ) dos micro-organismos viáveis após incubação.

### 5.6 Ensaio de determinação da viabilidade bacteriana em suspensão de células planctônicas

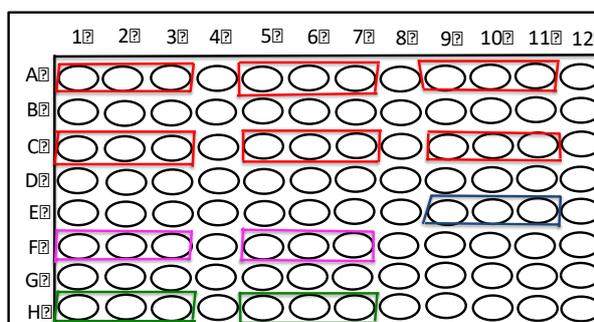
Para este ensaio foram testados nos dois modelos de suspensão planctônicas, TSB e solução salina a 0,89%, quatro concentrações para RB e RBNP (0,031, 0,062, 1 e 2  $\mu\text{M}$ ), correspondendo as concentrações de MIC e MBC dos fotossensibilizadores. Essas concentrações foram estudadas agindo sem a interferência da luz e com a luz. O LED operou três densidades de energia. Grupos controle, LED e Digluconato de Clorexidina a 0,12% também foram realizados, totalizando os seguintes grupos para cada fotossensibilizador:

- Controle;
- Digluconato de Clorexidina a 0,12% (CHX);
- LED 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;
- RB 0,031; 0,062; 1 e 2  $\mu\text{M}$
- RBNP 0,031; 0,062; 1 e 2  $\mu\text{M}$
- RB 0,031  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RB 0,062  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RB 1  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RB 2  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RBNP  $\rightarrow$  0,031  $\mu\text{M}$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RBNP 0,062  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RBNP 1  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- RBNP 2  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  LED 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$

O inóculo foi preparado em caldo TSB suplementado com extrato de levedura e 1% de glicose à semelhança do realizado no item 5.3. A suspensão permaneceu em estufa por um período de 18 horas, 37°C e atmosfera parcial de 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, essa suspensão foi ajustada em solução salina ou caldo TSB, a fim de se obter uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

A fonte de luz utilizada foi a mesma descrita no item 5.2. Em cada experimento realizado, três tempos de irradiação foram testados (60 s, 120 s e 180 s), correspondendo as três densidades de energia, variando-se as concentrações de RB e RBNP, correspondendo a CIM e a CBM determinadas nos ensaios anteriores. Em cada poço da placa de 96 poços foram distribuídos 100 µL da suspensão bacteriana ajustada + 100 µL do fotossensibilizador (RB ou RBNP). Durante o período de pré-irradiação (5 min), o fotossensibilizador foi mantido ao abrigo da luz (ZANIN *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2013). Por experimento foram testados duas concentrações para cada FS seguidos dos demais grupos, como segue: FS A + inóculo + LED 10,05 J.cm<sup>-2</sup>; FS A + inóculo + LED 6,70 J.cm<sup>-2</sup>; FS A + inóculo + LED 3,35 J.cm<sup>-2</sup>; FS B + inóculo + LED 10,05 J.cm<sup>-2</sup>; FS B + inóculo + LED 6,70 J.cm<sup>-2</sup>; FS B + inóculo + LED 3,35 J.cm<sup>-2</sup>; Sol. Salina + inóculo + LED 10,05 J.cm<sup>-2</sup>; FS A + inóculo; FS B + inóculo; Sol. Salina + inóculo; Clorexidina (CHX) + inóculo. Os códigos A e B correspondem analogamente às duas concentrações testadas, que são concentrações equivalentes a CIM e CBM de ambos os fotossensibilizadores (Fig. 6 e 7). Após o término do tratamento, o conteúdo de cada poço (200 µL) foi retirado, diluído (1:10) e semeado (10 µL) em BHI ágar por 48 horas em 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a fim de determinar a presença ou a ausência das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em cada diluição correspondente (Fig. 8). Todos os grupos foram feitos em triplicatas técnicas, no mesmo dia, e em triplicatas biológicas em dias diferentes.

Figura 6: Desenho da placa de 96 poços utilizada no experimento com os 11 grupos experimentais.



Linhas A e C: 0,1 mL do inóculo + 0,1 mL do FS + LED 180 s, 120 s e 60 s

Linha E: 0,1 mL do inóculo + 0,1 mL de solução salina + LED 180s

Linha F: 0,1 mL do inóculo + 0,1 mL do FS

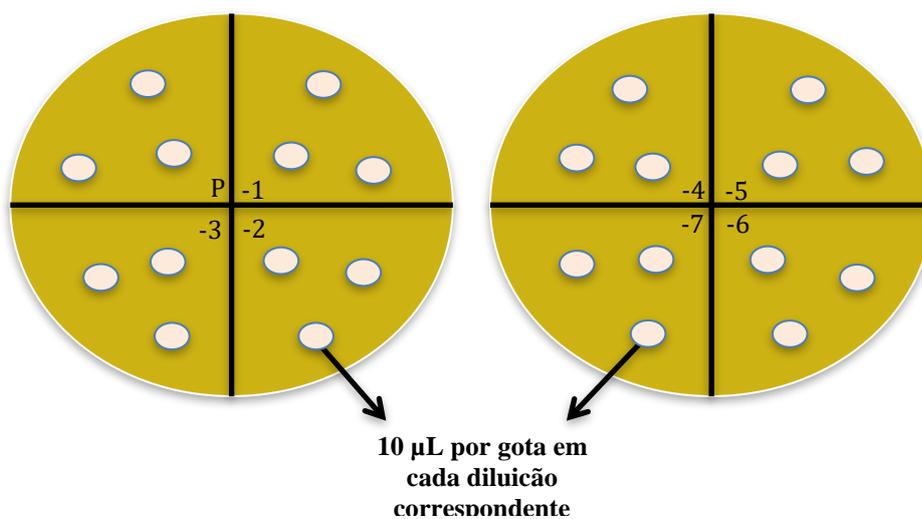
Linha H: controle negativo Salina ( 0,1 mL do inóculo + 0,1 mL de solução salina)  
controle positivo CHX (0,1 mL do inóculo + 0,1 mL de CHX)

Figura 7: Placa utilizada para a irradiação, cujo diâmetro do orifício corresponde ao diâmetro do poço da placa de 96 poços.



Fonte própria

Figura 8: Desenho das placas de culturas com BHI ágar utilizadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).



Fonte própria. Cada quadrante representa uma diluição. Assim, temos diluições do P (puro) ao -7, divididas em duas placas para cada grupo em estudo.

### **5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O aspecto morfológico das partículas de RB e RBNP foi visualizado utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura FEI® INSPECT F50. As partículas foram fixadas em “stubs” com fita dupla-face de carbono e cobertas por uma fina camada de 10 nm de ouro, utilizando o sistema de metalização Quorum Q150T ES.

### **5.8 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IR)**

O espectro vibracional na região do infravermelho foi obtido a partir de amostras em estado sólido do FS RB, RBNP e  $\alpha$ -CD. As amostras foram previamente dispersas e misturadas com brometo de potássio (KBr). Em seguida, foram prensadas sob pressão de 10 toneladas para formação de uma pastilha. A análise é realizada pelo grau de interação do feixe com a pastilha recém-preparada. Para isso, foi utilizado um espectrômetro ABB Bomem FTIR, modelo 2000-120 FTLA com janela espectral de 400 dos 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **5.9 Análise Estatística**

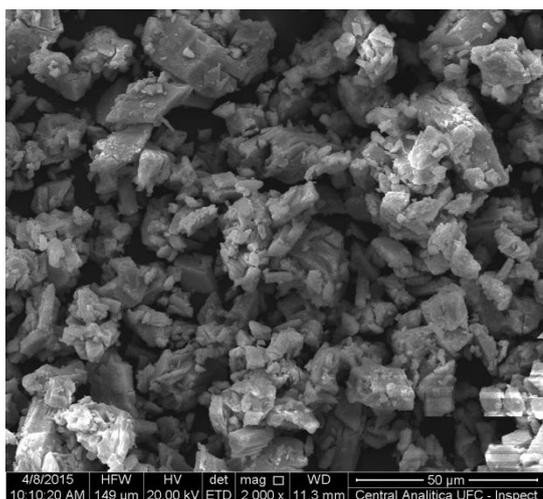
Os dados absolutos das UFCs foram transformados em logarítmo na base 10. Calculou-se média, mediana e desvio padrão. O intervalo de confiança foi estabelecido em 95% e nível de significância em 5% ( $p < 0,05$ ). Para verificação da normalidade dos dados foi aplicado o teste D' Agostino-Pearson. A comparação entre os diversos grupos experimentais foi realizada utilizando os teste ANOVA one-way, seguido de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis, seguido de Dunn (dados não paramétricos). Para comparação de cada grupo, nos dois modelos de suspensão planctônicas (solução salina e caldo TSB) foram utilizados teste t não-pareado (dados paramétricos) e teste Mann-Whitney (dados não paramétricos). Foi realizado teste de Grubb para verificação de dados outliers (valores extremos).

## 6 RESULTADOS

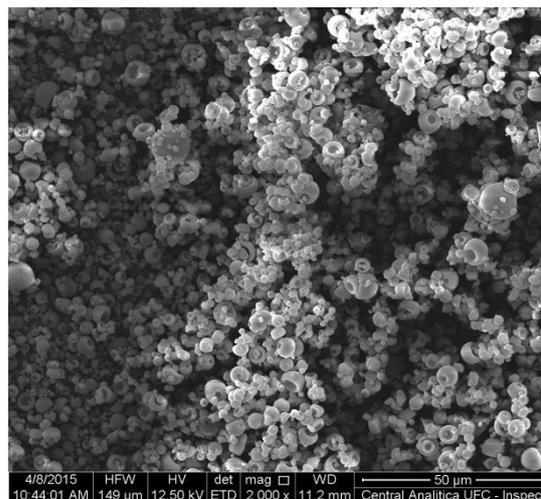
### 6.1 Captação das imagens da morfologia do RB e RBNP e análise do espectro infravermelho (IR)

A análise por MEV evidenciou nanopartículas com forma esférica e superfície lisa (Fig. 9) após o encapsulamento. A eficiência do encapsulamento do RB pela  $\alpha$ -CD pode ser comprovada pela análise do espectro na região do infravermelho, onde se observa o pico em  $1.549\text{ cm}^{-1}$  presente no RB, ausente na  $\alpha$ -CD e presente no RBNP (Gráfico 1).

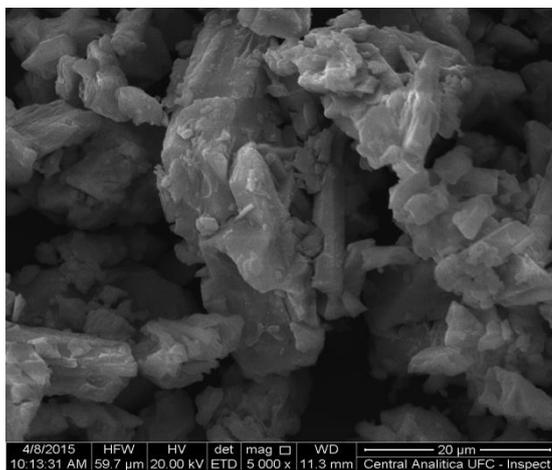
Figura 9: Aspecto morfológico do corante rosa bengala em forma livre (A e C) e em nanoformulação com alfa-ciclodextrina (B e D).



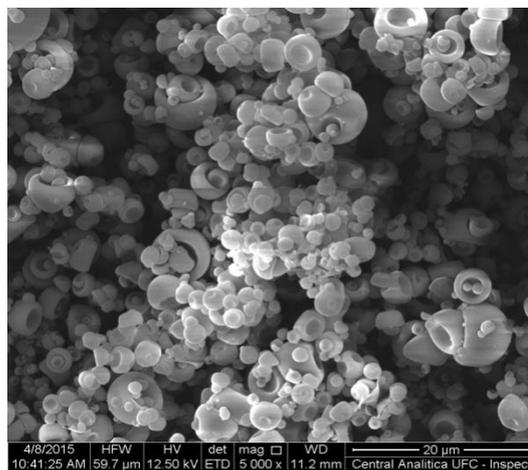
(A)



(B)

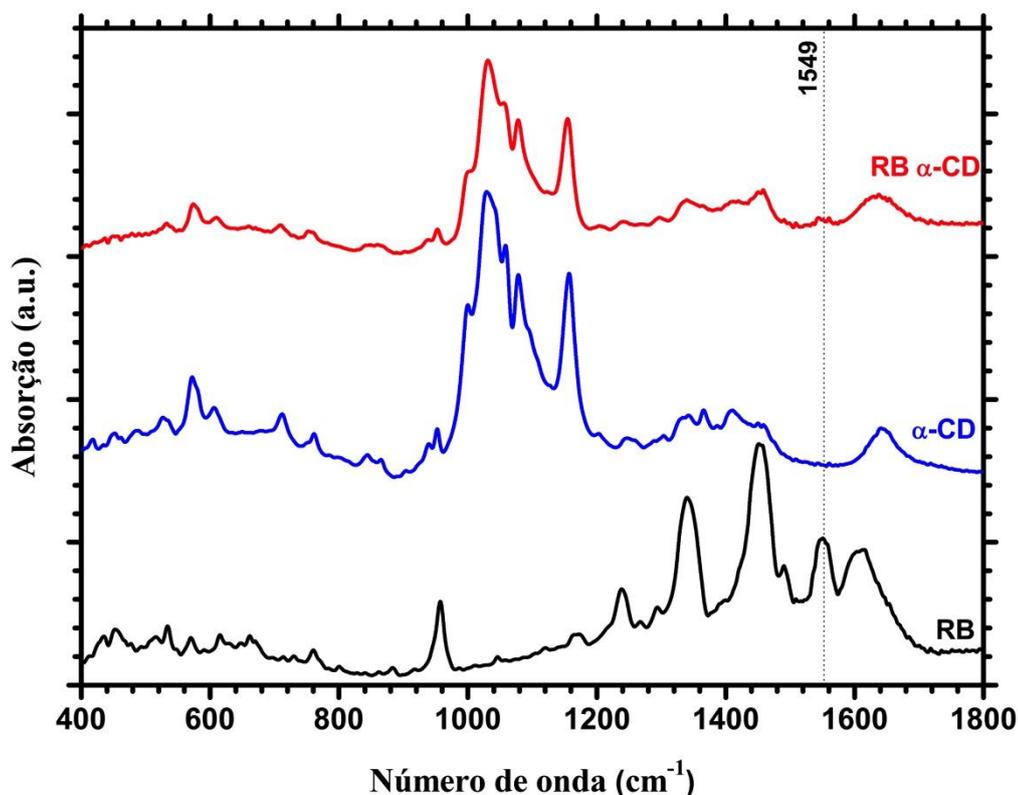


(C)



(D)

Gráfico 1: Análise do espectro do infravermelho para RB, alfa-CD e RBNP (RB  $\alpha$ -CD).



## 6.2 Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para *Rosa bengala*

Para o ensaio de determinação da CIM, foi utilizada a concentração inicial de 16  $\mu\text{M}$ , seguida de 10 diluições binárias. Logo, as concentrações utilizadas variaram de 8 a 0,015  $\mu\text{M}$ . O ajuste do inóculo inicial para a concentração de  $1-2 \times 10^6$  UFC/mL foi realizado com o auxílio da escala McFarland e espectrofotômetro. A confirmação ainda foi aferida por plaqueamento do inóculo inicial. Leituras de absorvâncias (492 nm) das suspensões planctônicas de *S. mutans* UA 159 após 24 horas de contato com diferentes concentrações de RB mostraram que a CIM correspondia à concentração de 2  $\mu\text{M}$ .

Para determinar a CBM, realizou-se o plaqueamento de uma alíquota (25  $\mu\text{L}$ ) da diluição que representa a CIM (2  $\mu\text{M}$ ) e duas concentrações acima (4  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ ). A CBM, por definição do NCCLS (2006), é aquela concentração que mata 99,99 % do inóculo inicial. A concentração considerada CBM foi a de 4  $\mu\text{M}$ , onde nenhuma UFC/ mL foi observada pelo método utilizado.

De modo semelhante ao já descrito para o Rosa bengala, foi realizada a determinação da CIM para RB associado a um LED de fonte de luz azul (TFD). Leituras de absorvâncias (492 nm) das suspensões planctônicas de *S. mutans* UA 159 após 24 horas de contato com diferentes concentrações de RB identificaram como a CIM a concentração de 1  $\mu\text{M}$ . A CBM, determinada da mesma forma descrita anteriormente, foi a concentração de 2  $\mu\text{M}$ .

### **6.3 Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para RBNP**

Utilizou-se a concentração inicial de 4  $\mu\text{M}$ , seguida de 10 diluições binárias. Logo, as concentrações utilizadas variaram de 2 a 0,0019  $\mu\text{M}$ . O ajuste do inóculo inicial para a concentração de  $1-2 \times 10^6$  UFC/mL foi realizado de forma semelhante ao item anterior. Leituras de absorvâncias (492 nm) de suspensões planctônicas de *S. mutans* UA159 após 24 horas de contato com diferentes concentrações de RBNP resultaram em CIM de 0,125  $\mu\text{M}$ . A CBM correspondeu à concentração equivalente à 0,25  $\mu\text{M}$ , determinada de modo semelhante ao já descrito inicialmente, onde nenhuma UFC/mL foi observada.

Semelhantemente, foi realizada a determinação da CIM para o RBNP associado a um LED de fonte de luz azul (TFD). Leituras de absorvâncias (492 nm) de suspensões planctônicas de *S. mutans* UA159 após 24 horas de contato com diferentes concentrações de RBNP associado ao LED evidenciaram que a menor concentração com ausência de turvação foi referente à concentração de 0,031  $\mu\text{M}$  e, portanto, esta foi considerada a CIM. A concentração considerada CBM foi a de 0,062  $\mu\text{M}$ , onde não foi visualizado nenhum crescimento microbiano.

### **6.4 Ensaio de determinação da CIM e CBM para $\alpha$ -ciclodextrina**

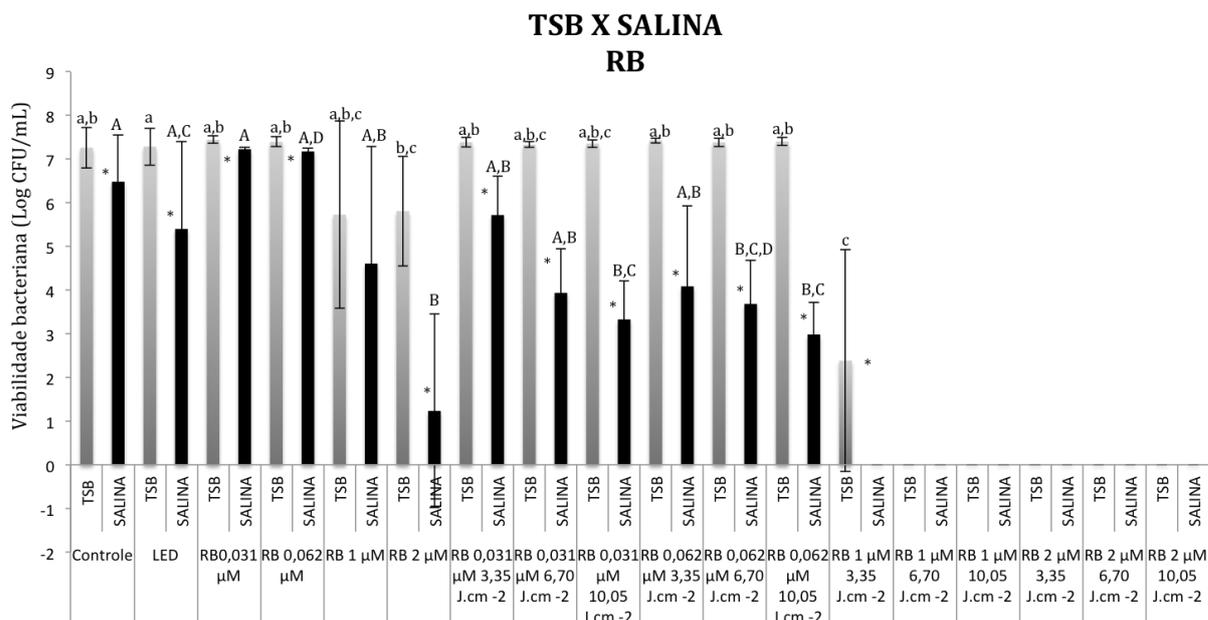
Para o ensaio de determinação da CIM, foi utilizada a concentração inicial de 32  $\mu\text{M}$ , seguida de 10 diluições binárias. Logo, as concentrações utilizadas variaram de 16 a 0,015  $\mu\text{M}$ . O ajuste do inóculo inicial para a concentração de  $1-2 \times 10^6$  UFC/mL foi realizado com o auxílio da escala McFarland e espectrofotômetro. A concentração ainda foi aferida pelo plaqueamento do inóculo inicial. Leituras de absorvâncias (492 nm) de suspensões planctônicas de *S. mutans*

UA 159 após 24 horas em contato com alfa-ciclodextrina não evidenciou diferenças expressivas nos valores dessas absorvâncias aferidas nas concentrações testadas. Portanto, pode-se concluir que  $\alpha$ -CD não possui atividade antimicrobiana quando utilizada isoladamente.

### **6.5 Viabilidade bacteriana na TFD em diferentes tempos de irradiação, avaliando o modelo de suspensão de células planctônicas em solução salina (0,89%) e em TSB.**

A terapia fotodinâmica mostrou uma redução significativa na viabilidade bacteriana em ambos os meios utilizados no modelo de suspensão de células planctônicas e ambos os fotossensibilizadores (RB e RBNP) em diferentes tempos de irradiação ( $p < 0,05$ ). Para o RB, observou-se que nas concentrações 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ , o tempo de irradiação não influenciou na redução da viabilidade bacteriana de culturas planctônicas em solução salina, apresentando ausência de crescimento semelhante à visualizada nos grupos CHX 0,12%. No entanto, para as concentrações 0,031  $\mu\text{M}$  e 0,062  $\mu\text{M}$ , apesar de os tempos de irradiação mostrarem mais eficiência utilizando suspensões de *S. mutans* em solução salina, o tempo correspondente a 6,70  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  mostrou melhor efeito na concentração 0,062  $\mu\text{M}$ , enquanto que a 10,05  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  e 3,35  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  não houve diferenças estatisticamente significantes entre esses dois grupos ( $p < 0,05$ ). De modo geral, o modelo solução salina (0,89%) mostrou uma contagem inferior do número de UFC/mL quando comparado ao seu correspondente no modelo TSB ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2).

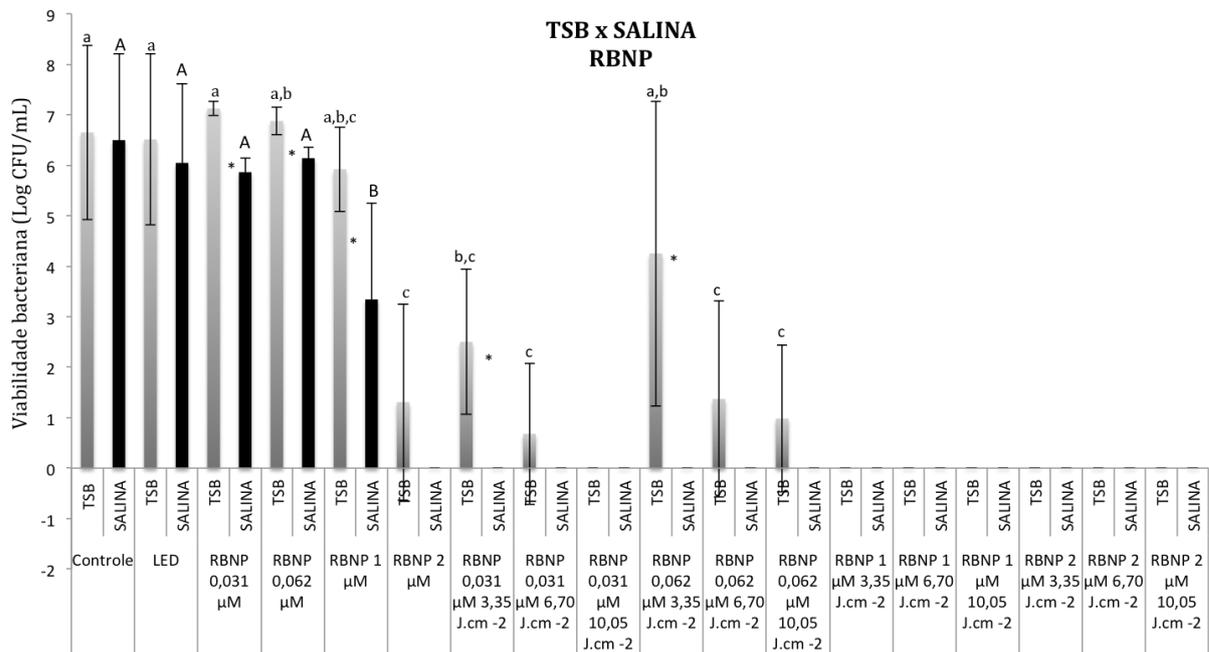
Gráfico 2: Redução da viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais com RB.



Viabilidade bacteriana (Log CFU/mL) de suspensões de *S. mutans* após exposição aos diversos grupos experimentais, utilizando o fotossensibilizador Rosa bengala (RB). Os dados representam os valores médios das triplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas representam diferenças observadas na comparação entre os diversos grupos no caldo de cultura TSB. Letras maiúsculas representam diferenças observadas na comparação entre os diversos grupos em solução salina (NaCl 0,89%). O símbolo (\*) representa diferença observada na comparação de cada grupo nas duas soluções (TSB e Salina).

Para o FS rosa bengala nanoparticulado com  $\alpha$ -CD, nenhuma diferença foi encontrada entre os modelos de suspensão de células planctônicas em solução salina (0,89%) e TSB em relação ao grupo LED e ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Como já esperado, as concentrações 1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M não mostraram crescimento bacteriano na TFD. No entanto, as suspensões de *S. mutans* em TSB, 0,031  $\mu$ M e 0,062  $\mu$ M mostraram efeitos equivalentes nas densidades de energia correspondentes a 6,70 J.cm<sup>-2</sup>, enquanto que a 3,35 J.cm<sup>-2</sup>, 0,031  $\mu$ M apresentou melhor efeito. Nas suspensões de *S. mutans* em solução salina (0,89%), não se observou crescimento bacteriano na TFD em nenhuma das concentrações testadas, semelhantemente ao grupo CHX 0,12% (Gráfico 3).

Gráfico 3: Redução da viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais com RBNP.



Viabilidade bacteriana (Log CFU/mL) de suspensões de *S. mutans* após exposição aos diversos grupos experimentais, utilizando o fotossensibilizador Rosa bengala nanoparticulado com alfa-ciclodextrina (RBNP). Os dados representam os valores médios das triplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas representam diferenças observadas na comparação entre os diversos grupos no caldo de cultura TSB. Letras maiúsculas representam diferenças observadas na comparação entre os diversos grupos em solução salina (NaCl 0,89%). O símbolo (\*) representa diferença observada na comparação de cada grupo nas duas soluções (TSB e Salina).

## 7 DISCUSSÃO

A prevenção de lesões de cárie dentária se dá tradicionalmente pela remoção mecânica ou controle não-específico da placa dental. O uso de agentes antimicrobianos atua de forma complementar ao controle mecânico da placa (BAEHNI; TAKEUCHI, 2003). Estratégias que previnam idealmente o biofilme da placa em formação, sem afetar o equilíbrio biológico da cavidade oral, sítio habitado por mais de 1.000 diferentes espécies de bactérias, contendo  $10^8$ - $10^9$  bactérias por mL de saliva (VAN DER OUDERAA, 1991), apresentam um papel interessante no controle da doença. A clorexidina (digluconato de clorexidina 0,12%), agente antimicrobiano de escolha para inibição da formação de biofilmes cariogênicos (AUTIO-GOLD, 2008) foi utilizada como controle positivo deste estudo.

A terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo estudada como uma ferramenta valiosa no controle de bactérias da placa dental (WOOD *et al.*, 2006; VAHABI *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2013; RICATTO *et al.*, 2014). Uma das vantagens da morte bacteriana pela ativação do FS pela luz é que a resistência à ação do oxigênio singlete é improvável de acontecer, em comparação com a experiência com agentes antimicrobianos químicos tradicionais, como os antibióticos (MacROBERT *et al.*, 1989).

O uso de nanopartículas dentro da TFD vem sendo investigado. Nanopartículas contendo fotossensibilizadores têm várias vantagens sobre as moléculas de fotossensibilizante não encapsulados em nanopartículas. Estas vantagens incluem uma maior massa crítica (pacote concentrado de FS) para a produção de espécies reativas de oxigênio; a limitação da capacidade da célula-alvo para bombear a molécula do fármaco para fora, reduzindo, assim, a possibilidade de resistência a múltiplas drogas; a seletividade de tratamento por agentes de liberação localizada, que podem ser obtidos por um direcionamento passivo ou ativo através da superfície carregada das nanopartículas, e o fato de a matriz das nanopartículas não ser imunogênica (KOO *et al.*, 2007). Por exemplo, um complexo biodegradável e biocompatível (ácido láctico-co-glicólico) (PGLA) e nanopartículas de ouro, carregadas com azul de metileno (AM) e expostas à luz vermelha a 665 nm (densidade de energia de  $100 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) foram testadas contra culturas planctônicas de *E. faecalis* em canais radiculares infectados. Houve sinergismo entre a luz e o AM nanoparticulado, diminuindo a carga microbiana cerca de  $2-1 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$  em comparação ao grupo controle (PAGONIS *et al.*, 2010). O efeito do PGLA em nanoformulação com AM na TFD também foi investigado em suspensões da placa dental oriundas de pacientes com periodontite crônica, expostas à luz vermelha a 665 nm e densidade de energia de 100

$\text{mW.cm}^{-2}$ , no entanto, apesar da redução observada com a adição da nanopartícula, os resultados não foram estatisticamente significantes (CERAJ *et al.*, 2011).

O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica com dois fotossensibilizadores (RB e RBNP) e uma fonte de luz azul (LED azul) contra suspensões de *S. mutans*. A escolha do LED ao invés do LASER foi devida à sua banda de emissão mais ampla, menor tamanho, peso e custo reduzidos do aparelho, maior flexibilidade no tempo de irradiação e também facilidade do manuseio (ZANIN *et al.*, 2005; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Especificamente os LEDs azuis já são usados no cotidiano da prática odontológica, não danificando os tecidos orais (PEREIRA *et al.*, 2013). Na TFD, LEDs têm demonstrado ausência de ação antimicrobiana quando aplicados sozinhos (PELOI *et al.*, 2008; DOVIGO *et al.*, 2011).

RB em uma concentração de  $2 \mu\text{M}$  foi testado contra suspensões de *S. mutans*, contendo  $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  a uma densidade de energia de  $95 \text{ J.cm}^{-2}$ , correspondendo ao tempo de irradiação de 180 s (COSTA *et al.*, 2010). O ajuste do inóculo foi feito em tampão salina-fosfato (PBS). A quantidade do FS e do inóculo colocados na placa de 96 poços foi a mesma dispensada neste trabalho,  $100 \mu\text{L}$  para ambos. Os resultados não mostraram diferença entre os grupos onde o FS agiu sozinho, sem a presença da luz, e o grupo controle. Entretanto, para os grupos irradiados com o LED azul (440 nm- 460 nm), obteve-se uma redução de  $6.86 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$  em relação ao grupo controle. Apesar desses dados, deve-se atentar que a inexistência de atividade antimicrobiana do RB na concentração de  $2 \mu\text{M}$  não condiz com os resultados encontrados neste trabalho, onde esta concentração corresponde ao MBC para uma suspensão de  $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . Adicionalmente, o LED utilizado não possui a faixa de comprimento de onda adequada para que haja a máxima ativação do FS. Rolim *et al.* (2012) demonstraram que a ativação ótima da luz pelo FS rosa bengala ocorre na região do espectro de emissão do comprimento de onda entre 510- 560 nm com pico máximo de absorção em torno 550 nm. O LED azul utilizado neste trabalho possui comprimento de onda predominante em 520 nm, favorecendo a ativação do RB pela luz irradiada com a consequente produção das espécies reativas de oxigênio. Paralelamente a este fato, a distância do LED à área irradiada foi de 6 mm, diferentemente deste trabalho em que a distância foi de 3 mm. Sabe-se que a dose aumenta à medida que a área irradiada diminui, e que a distância da fonte de luz à região a ser irradiada entra no cálculo da área. Portanto, quanto menor a distância da fonte de luz à região de interesse a ser irradiada, maior será a dose e maior será a penetração na célula bacteriana. Apesar da dose de energia aplicada neste trabalho ser bastante inferior a dose desse autor, a efetividade do correto comprimento de onda do LED para ativação máxima do FS associado a

uma menor distância da fonte de luz ao poço irradiado da placa de 96 poços podem explicar os melhores resultados obtidos neste trabalho mesmo para uma suspensão planctônica de *S. mutans* contendo  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup>.

Segundo Paulino *et al* (2005), a aplicação de RB em concentrações abaixo de 5,0 µM no escuro não foi tóxica para fibroblastos. Logo, as concentrações utilizadas (0,031 µM, 0,062 µM, 1 µM e 2 µM) não exercem citotoxicidade às células humanas, podendo ter aplicabilidade em futuros estudos *in vivo*. Apesar de o FS rosa bengala ter atividade nas concentrações de 1 µM e 2 µM na ausência da luz, esse composto mostrou atividade na TFD em concentrações menores, as quais quando agindo sozinho não apresenta, podendo portanto ser considerado um fotossensibilizante, em concordância com o princípio básico da TFD em que a aplicação do FS ou da fonte luz sozinhos não pode ter efeito antimicrobiano. No presente estudo foram investigados três tempos de irradiação (60 s, 120 s e 180s). Para o modelo em TSB não houve diferença na redução da viabilidade microbiana quando comparado ao grupo controle nas menores concentrações (0,031 µM e 0,062 µM) nos tempos de irradiação aplicados. Entretanto para o modelo em solução salina 0,89% as reduções foram de 3,16 log<sub>10</sub> CFU.mL<sup>-1</sup> e 3,50 log<sub>10</sub> CFU.mL<sup>-1</sup>, para as respectivas concentrações acima citadas, em comparação ao grupo controle na densidade de energia máxima (10,05 J.cm<sup>-2</sup>), que corresponde ao tempo de irradiação de 180 s.

A atividade antimicrobiana da TFD contra suspensões de *S. mutans* utilizando diferentes FSs, tais como RB, eritrosina, eosina, AM, TBO e verde malaquita, e um fotopolimerizador a 24 J.cm<sup>-2</sup> foi investigada (ROLIM *et al.*, 2012). Todos os corantes foram usados na concentração de 163,5 µM. RB foi citotóxico, agindo sozinho, sem a presença da luz, de modo que não foi possível fazer uma comparação com os demais FSs utilizados na TFD. Fato discordante dos resultados deste trabalho, em que RB sozinho não exerceu atividade antimicrobiana, exceto nas concentrações de CIM e CBM. Provavelmente devido à alta concentração utilizada mais de 100x a concentração da CIM encontrada neste trabalho.

Recentemente, a ação de RB contra suspensões de *S. mutans* na TFD foi comparada a atividade de outros dois FSs, o AM e a curcumina (CUR), associados a uma fonte de luz branca (570 nm) a 90 mW.cm<sup>-2</sup> (LOZANO *et al.*, 2015). As concentrações necessárias de RB para fotoinativar *S. mutans* variaram de 0,305-0,61 µM. Enquanto que para o AM foram de 1,23-2,46 µM e para a CUR, 78,61-157,22 µM. Os resultados obtidos corroboram com este trabalho pelo fato de baixas concentrações de RB serem efetivas na redução da viabilidade microbiana de *S. mutans* na TFD. Apesar do LED utilizado neste trabalho ter baixa densidade de energia,

os resultados aproximados obtidos podem ser explicados pelo correto comprimento de onda da fonte de luz necessário para fotoativar o FS.

Para o outro fotossensibilizador estudado neste trabalho, RBNP, os resultados obtidos foram melhores do que os de RB. O modelo de suspensão planctônica em TSB, para os grupos onde foi aplicada a terapia fotodinâmica, mostrou crescimento microbiano apenas para as menores concentrações (0,031  $\mu\text{M}$  e 0,062  $\mu\text{M}$ ), nas demais concentrações, a ausência de crescimento foi semelhante a observada no grupo CHX. Contudo, a redução foi entre 2,39-5,97  $\log_{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup> em relação aos grupo controle. Nos grupos com atuação apenas do FS não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle, exceto na concentração 2  $\mu\text{M}$  para o modelo de suspensão em TSB. Esse fato pode ser devido a inexistência de uma quantificação exata do encapsulamento de RB pela  $\alpha$ -CD, pois sabe-se apenas que interagiram, mas não se conhece se a forma de interação foi máxima e se foi homogênea para todas as partículas do pó do FS rosa bengala que passaram pelo Spray-Dryer. Já o modelo em solução salina não mostrou nenhum crescimento microbiano em todas as concentrações estudadas nas três densidades de energia utilizadas, resultando em uma redução de 6,49  $\log_{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup> em comparação ao grupo controle. Mesmo sem os dados absolutos da eficiência do encapsulamento, a TFD foi bastante satisfatória ainda que aplicada em concentrações baixíssimas, onde a cor do FS na solução é praticamente imperceptível, comprovando que a adição da  $\alpha$ -ciclodextrina ao RB favoreceu o seu potencial antimicrobiano na TFD em ambos os modelos de suspensão planctônicas. O efeito da complexação de ciclodextrina sobre a fotoreactividade dos fotossensibilizadores do grupo xanteno tem sido objeto de estudo (FLAMIGNI, 1994). A complexação feita pela ciclodextrinas geralmente produz modificações nas propriedades físico-químicas das moléculas fotossensibilizantes, particularmente na sua fotoreatividade (NOWAKOWSKA, 2001). O cromóforo do corante ou fotossensibilizador incluído na cavidade da ciclodextrina encontra um ambiente relativamente hidrofóbico e, muitas vezes, tem a possibilidade de formar ligações de hidrogênio com a ciclodextrina (REKHARSKY, 1998). Além disso, a presença das ciclodextrinas em solução pode ser útil na prevenção da auto-agregação do corante e sua foto-oxidação, conseqüentemente, sendo capazes de evitar uma diminuição da eficiência corante por meio de interações hidrofóbicas (ZARZYCKY, 1998). Até o presente momento, após uma ampla pesquisa, não foi encontrado trabalhos que abordassem a associação entre RB e  $\alpha$ -CD na TFD frente a micro-organismos cariogênicos, o que inviabilizou uma comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

De modo geral, o modelo de suspensão planctônica em solução salina mostrou, aparentemente, melhor resultado na terapia fotodinâmica quando comparado com TSB. No entanto, não se pode afirmar claramente que esse modelo foi eficiente em manter a viabilidade bacteriana, pois a escassez de nutrientes da solução salina pode ter levado a uma morte celular precoce. Não foi encontrado na literatura trabalhos que discutissem diferenças entre modelos de suspensão planctônica na TFD. Este estudo buscou sanar um questionamento acerca da interação da fonte de luz com a cor do meio de cultura utilizado, testando esses dois modelos de suspensão planctônica (TSB e solução salina), partindo-se da hipótese de que a cor do caldo de cultura resultasse em alguma mudança na passagem da luz e consequente ativação do FS dentro da solução. Fato que poderia explicar o melhor desempenho do modelo de suspensão planctônica em solução salina para ambos os fotossensibilizadores utilizados, caso não tivesse sido observada a redução da viabilidade microbiana em todos os grupos estudados neste modelo.

O modelo de suspensão em TSB parece ser o mais indicado devido a ausência de divergência entre os resultados encontrados. Adicionalmente, sua execução diminui uma etapa do procedimento, pois o ajuste da cepa já é realizado neste meio de cultura.

Contudo, mais estudos são necessários a fim de investigar possíveis formas de ganho ou perda (interferência) na passagem da luz pelo meio de cultura com o objetivo de otimizar essa interação e seus efeitos.

## **CONCLUSÃO**

O modelo de células planctônicas com salina parece apresentar menores contagens

microbianas quando comparado ao modelo com TSB. No entanto, o TSB parece não interferir na ação da terapia fotodinâmica, já que os grupos com esta terapia não apresentaram resultados divergentes quando aplicados nos dois modelos.

A terapia fotodinâmica realizada com RB ou RBNP foi efetiva da redução de carga microbiana em suspensões de *S. mutans*. A adição da nanopartícula favoreceu o efeito antimicrobiano do RB, contudo, mais estudos são necessários a fim de investigar os efeitos da terapia em biofilmes cariogênicos formados *in vitro* e *in situ*.

## REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; FLOYD E. DEWHIRST, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p.

5721–5732, 2005.

AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEMA, A.; MERLEVEDE, W.; WITTE, P. A. M. Hypericin in cancer treatment: More light on the way. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 221, 2002.

ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 11, p. 1175-1186, 2010.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.H.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v.1, p.27-42, 2004.

AUTIO-GOLD, J. The role of chlorhexidine in caries prevention. **Operative Dentistry**, v. 33, suppl. 6, p. 710-716, 2008

BAEHNI, P. C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Dis.**, v. 9, Suppl. 1, p. 23-29, 2003.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci.**, v. 9, p.1267- 1277, 2004.

BORGES, F. M. C.; MELO, M. A. S.; LIMA, J. M. P.; ZANIN, I. C. J.; RODRIGUES, L. K. A.; NOBRE-dos-SANTOS, M. Evaluation of the effect of photodynamic antimicrobial therapy in dentin caries: a pilot *in vivo* study. Proc. of SPIE, v. 7549, 75490B-1, 2010.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **J Am Dent Assoc.** v. 133, p. 1405-1407, 2002.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados Principais.** Brasília, 2011.

CERAJ, V. K.; PATEL, N.; SONG, X.; HOLEWA, C.; PATEL, C.; KENT, R.; AMIJI, M. M.; SOUKOS, N. S. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 600-606, 2011.

CHANG, C.; YANG, Y.; YANG, J.; WU, H.; TSAI, T, Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. **Dyes Pigments**, v.79, p.170-175, 2008.

CHUI, C.; HIRATSUKA, K.; AOKI, A.; TAKEUCHI, Y.; ABIKO, Y.; IZUMI, Y. Blue LED inhibits the growth of *Porphyromonas gingivalis* by suppressing the expression of genes associated with DNA replication and cell division. **Lasers Surg. Med.**, v. 44, n.10, p. 856-864, 2012.

CHUI, C.; AOKI, A.; TAKEUCHI, Y. et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontal Res.**, v. 48, n. 6, p. 696-705, 2013.

CLSI. **M07-A9**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 2012.

COSTA, A. C. B. P.; CHIBEBE JUNIOR, J.; MACHADO, A. K. S.; BELTRAME JUNIOR, M.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. **Braz. Oral Res.**, v. 24, n. 4, p. 413-418, Oct./Dec. 2010.

COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N., GORDON, J. I., AND KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v.326, p.694–1697, 2009.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz. Oral Res.**, v. 23, Suppl. 1, p. 23-30, 2009.

DAVID, L. A.; MATERNA, A. C.; FRIEDMAN, J.; CAMPOS-BAPTISTA, M. I.; BLACKBURN, M. C.; PERROTTA, A.; ERDMAN, S. E.; ALM, E.J. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. **Genome Biol.**, v. 15, n.7, 2014.

DENIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of Photodynamic therapy. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 61, p. 340-348, 1991.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. O.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses.**, v. 54, n. 2, p. 123-130, 2011.

DUARTE, S.; KLEIN, M. I.; AIRES, C. P.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Influences os starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 206-212, 2008.

FLAMIGNI, L. Effects of complexation by cyclodextrins on the photoreactivity of Rose Bengal and Erythrosin B. A laser flash photolysis investigation. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**,v. 90 suppl.16, p. 2311-2336, 1994.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária**: a doença e seu tratamento clinico. 1. ed. São Paulo: Santos, 2005.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária**: a doença e seu tratamento clinico. 2. ed. São Paulo: Santos, 2011.

FINI, P.; LOSETO, R.; CATUCCI, L.; COSMA, P.; AGOSTIANO, A. Study on the aggregation and electrochemical properties of Rose Bengal in aqueous solution of cyclodextrins. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 44–49, 2007.

FREITAS, P. M.; SIMÕES, A. **Lasers in dentistry: guide for clinical practice**. 1<sup>st</sup> ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2015.

GARCEZ, A. S.; NUNEZ, S. C.; AZAMBUJA JUNIOR, N.; FREGNANI, E. R.; RODRIGUEZ, H. M. H.; HAMBILN, M. R.; SUZUKI, H.; RIBEIRO, M. S. Effects of photodynamic therapy on Gram-Positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. **Photomed. Laser Surg.**, v. 31, n. 11, p. 519-525, 2013.

GARCÍA-GRANERO, R.; LAHOZ, F. J.; PAULMANN, C.; SAOUANE, S.; FABBIANI, F. P. A. A novel hydrate of  $\alpha$ -cyclodextrin crystallised under high-pressure conditions. **Cryst. Eng. Comm.**, v. 14, p. 8664-8670, 2012.

GURSOY, H.; OZCAKIR-TOMRUK, C.; TANALP, J.; YILMAZ, S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest.*, v. 17, p. 1113-1125, 2013.

HARRIS, F.; SAYED, Z.; HUSSAIN, S.; PHOENIX, D.A. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitisers to act as PDT agents. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v.1, p. 231-239, 2004.

ISHIYAMA, K.; NAKAMURA, K.; IKAI, H.; KANNO, T.; KOHNO, M.; SASAKI, K.; NIWANO, Y. Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37871, 2012.

JERJES, W.; HAMDOON, Z.; HOPPER, C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. *Head & Neck Oncology* 2012, 4:16.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, n. 1, p. 3-7, May 2004.

KLEIN, M. I.; DUARTE, S.; XIAO, J.; MITRA, S.; FOSTER, T. H.; KOO, H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 837-841, 2009.

KOMERIK, N.; MACROBERT, A. J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 25, p. 487-504, 2006.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KOO, Y. E. L.; FAN, W.; HAH, H.; XU, H.; ORRINGER, D.; ROSS, B.; REHEMTULLA, A.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. Photonic explorers based on multifunctional nanoplateforms for biosensing and photodynamic therapy. **Appl. Opt.**, v. 46, p. 1924-1930, 2007.

KUBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Med. Laser Appl.**, v. 20, p. 37-45, 2005.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [S.l.]: Springer, 1999.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A. T. 'Ome sweet 'omics—a genealogical treasury of words. **Scientist** v. 15, p. 8–10, 2001.

LEITES, A. C. B.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239-252, 2006.

LEWINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

LI, K., BIHAN, M., AND METHE, B. A. Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. **PLoS ONE** v.8, e63139, 2013.

LINDHE, J. T. **Tratado de periodontologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LOZANO, P. S.; GILABERTE, Y.; PAZ-CRISTOBAL, M. P.; PÉREZ- LAMPAYA, V.; APORTA, J.; PÉREZ-LAGUNA, V.; GARCÍA-LUQUE, I.; REVILLO, M. U.; REZUSTA, A. In vitro effect photodynamic therapy with diferentes photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**., v. 15, p.187-194, 2015.

LOESCHE WJ. Role of *Streptococcus mutans* in a human dental decay. **Microbiol Rev.**v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

MacROBERT, A. J.; BOWN, S. G.; PHILLIPS, D.; What are the ideal photoproperties for a sensitizer? **Ciba Found Symp.**, v. 146, p. 4-12, 1989.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**., v.149, p.279–294, 2003.

MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. **Caries Res.**, v. 49, Suppl. 1, p. 46–54, 2015.

MELO, M. A.; ROLIM, J. P.; ZANIN, I. C.; BARROS, E. B.; DA-COSTA, E. F.; RODRIGUES, L. K. Chacterization of antimicrobial photodynamic therapy-treated *Streptococci mutans*: An atomic force microscopy study. **Photomed Laser Surg.**, v. 31, p. 105-109, 2013.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical J.**, v. 19, p. 129-141, 2011.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 5, p. 381-392, 2000.

NOWAKOWSKA, M.; SMOULUCH, M.; SENDOR, D. <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>The effect of cyclodextrins on the photochemical stability of 7-amino-4-methylcoumarin in aqueous solution **J. Inclusion**

**Phenom.Macrocycl. Chem.**, v. 40, p. 213-219, 2001.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.73, p. 1–28, 2004.

OLIVEIRA, C. M. **Película adquirida do esmalte**: a importância de seus componentes para a proteção contra a desmineralização do esmalte dentário, 2011. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

OLIVEIRA, B. P.; AGUIAR, C. M.; CAMARA, A. C. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontics infections. **Eur. J. Dent.**, v. 8, p. 424-430, 2014.

OMS. Geneva, 2014. Em <[http://www.who.int/oral\\_health/disease\\_burden/global/en/](http://www.who.int/oral_health/disease_burden/global/en/)> Acesso em: 29 set. 2014.

PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation— new insight. **J. Dental Res.**, v. 85, n. 10, p. 878-887, 2006.

PAGONIS, T. C.; CHEN, J.; FONTANA, C. R.; DEVALAPALLY, H.; RUGGIERO, K.; SONG, X.; FOSCHI, F.; DUNHAM, J.; SKOBE, Z.; YAMAZAKI, H.; KENT, R.; TANNER, A. C.; AMIJI, M. M.; SOUKOS, N.S. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **J. Endod.**, v. 36, p. 322-328, 2010.

PASCHOAL, M. A.; SANTOS-PINTO, L.; LIN, M.; DUARTE, S. *Streptococcus mutans* photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. **Photomed. Laser Surg.**, v. 32, n. 3, 2014.

PAULINO, T. P.; MAGALHÃES, P. P.; THEDEI JR, G.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of visible light-based photodynamic therapy to bacterial photoinactivation. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 33, p.46-49, 2005.

PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI JR., G.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer yo photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v.50, p.353-359, 2005.

PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J Biosci.**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

PEREIRA, C. A.; COSTA, A. C. B. P.; CARREITA, C. M.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. **Lasers Med. Sci.**, v. 28, p. 859-864, 2013.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. **Quim. Nova**, v. 304, n. 4, p. 988-994, 2007.

PETERSEN, P. E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S.; NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ.**, v.83, n.9, p.661–669, 2005.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: an overview, **Med. Laser. Appl.**, v. 18, p. 7–19, 2003.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamentals aspects. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, p. 259-268, 2008.

PORTO, C. L. A. *et al.* **Cariologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2008.

RAWAT, S.; JAIN, S. K. Solubility enhancement of celecoxib using  $\beta$ - cyclodextrin inclusion complexes. **European. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p. 263-267, 2004.

RAJESH, S.; KOSHI, E.; KOSHI, P.; MOHAN, A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 15, n. 4, p. 323-327, 2011.

REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. **Chem. Rev.** v. 98, p. 1875-1918, 1998.

RICATTO, L. G. O.; CONRADO, L. A. L.; TURSSI, C. P.; FRANÇA, F. M. G.; BASTING, R. T.; AMARAL, F. L. B. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light diode on cariogenic bacteria: An *in vitro* study. **Eur. J. Dent.**, v. 8, p. 509-514, 2014.

ROLIM, J. P. M. L.; MELO, M. A. S.; GUEDES, S. F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F. B.; SOUZA, J. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; ZANIN, I. C. J.; RODRIGUES, L. K. A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 5, p.106-146, 2012.

SALÚSTIO, P. J.; PONTES, P.; CONDUTO, C.; SANCHES, I.; CARVALHO, C.; ARRAIS, J.; MARQUES, H. M. C. Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. **AAPS PharmSciTech.**, v. 12, n. 4, Dec. 2011.

SANTIN, G. C.; OLIVEIRA, D. S. B.; GALO, R.; BORSATTO, M. C.; CORONA, A. M. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **Scientific World J.**, v. 2014.

SADAVA, D.; HELLER, C.; ORIANIS, G. H.; PURVES, W. K.; HILLIS, D. M. **Vida: A Ciência da Biologia**. 8. ed., v.1, Porto Alegre: Artmed, 2009.

SHRESTHA, A.; HAMBLIN, M. R.; KISHEN, A. Photoactivated rose Bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. **Nanomedicine**, v. 10, p. 491-501, 2014.

SOUSA, D. L.; LIMA, R. A.; ZANIN, I. C.; KLEIN, M. I., JANAL, M. N.; DUARTE, S. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. **PloS ONE.**, v. 10,

suppl. 7, 2015.

SUGITA, N.; KAWABATA, K.; SASAKI, K.; SAKATA, I.; UMEMURA, S. Synthesis of amphiphilic derivatives of rose bengal and their tumor accumulation. **Bioconjugate Chemistry**, v.18, p.866-873, 2007

TAKASAKI, A. A.; AOKI, A.; MIZUTANI, K. et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and periimplant diseases. **Periodontol.** **2000**, v. 51, p. 109-140, 2009.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J Dent Res.**, v. 90, n.3, p. 294–303, 2011.

TAVARES, A.; CARVALHO, C. M. B.; FAUSTINO, M. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n.1, p. 91-105, 2010.

TEIXEIRA, A. H.; PEREIRA, E. S.; RODRIGUES, L. K.; SAXENA, D.; DUARTE, S.; ZANIN, I. C. J. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *in vitro* and *in situ* biofilms. **Caries Res.**, v. 46, p. 549-554, 2012.

TENUTA, L. M.; CHEDID, S. J.; CURY, J. A. Uso de fluoretos em odontopediatria: mitos e evidências. In: MAIA, L. C.; PRIMO, L. G. **Odontopediatria clínica integral**. São Paulo: Ed. Santos, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UESUGI, N.; FURUMIYA, K.; MIZUTANI, T. Inhibition mechanism of UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 by xanthene food dyes. **J. Health Sci.**, v.52, p.549-557, 2006.

VAHABI, S.; FEKRAZAD, R.; AYREMLOU, S.; TAHERI, S.; ZANGENEH, N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. **J. Dent. (Tehran)**, v. 8, p. 48-54, 2011.

VAN DER OUDERAA, F. J. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 447-454, 1991.

WANG, J.-H.; WANG, B.; LIU, Q.; LI, Q.; HUANG, H.; SONG, L.; SUN, T.-Y.; WANG, H.; YU, X.-F.; LI, C.; CHU, P. K. Bimodal optical diagnostics of oral cancer based on Rose Bengal conjugated gold nanorod platform. **Biomaterials**, v. 34, n. 17, p. 4274-4283, 2013.

WANG, B.; WANG, J.-H.; LIU, Q.; HUANG, H.; CHEN, M.; LI, K.; LI, C.; YU, X.-F.; CHU, P. K. Rose-Bengal-conjugated gold nanorods for *in vivo* photodynamic and photothermal oral cancer therapies. **Biomaterials**, v. 35, p. 1954-1966, 2014.

WENZ, G.; HAN, B.-H.; MÜLLER, A. Cyclodextrin rotaxanes and polyrotaxanes. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 782–817, 2006.

WILSON, B. C. The physics of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, v. 31, p. 327–360,

1986.

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

WILSON, B. C.; PATTERSON, S. M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, v. 53, p. 61-109, 2008.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 680-684, 2006.

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

ZARZYCKY, P. K.; LAMPARCZYK, H. The equilibrium constant of beta-cyclodextrin-phenolphthalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 165-170, 1998.

ZHAO, T.; SHEN, X.; LI, L.; GUAN, Z.; GAO, N.; YUAN, P. et al. Gold nanorods as dual photosensitizing and imaging agents for two-photon photodynamic therapy. **Nanoscale**, v. 4, p. 7712-7719, 2012.