

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Nayane de Lanes Gonçalves

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*
FORMADO EM RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR

Belo Horizonte – MG

2018

Nayane de Lanes Gonçalves

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*
FORMADO EM RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito para conclusão do curso de
graduação em Odontologia da UFMG.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Amália Moreno

Belo Horizonte – MG

2018

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho representa a finalização de uma etapa muito importante da minha vida, e não teria sido concluída se não houvesse o apoio de muitas pessoas especiais. Agradeço aos meus pais por me darem a oportunidade de alcançar meu sonho; aos meus amigos e colegas de curso por tornarem essa jornada mais leve e alegre; aos mestres por todo aprendizado passado e por me inspirarem a cada dia, em especial a Profa. Amália Moreno, que foi minha orientadora possibilitando a conclusão deste trabalho. À Acecil - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. pela esterilização dos discos de resina acrílica utilizados neste estudo. À Profa. Ivana Márcia Alves Diniz pela colaboração do aparelho laser para a realização da Terapia Fotodinâmica. Além disso, agradeço em particular ao Laboratório de Interação Microrganismos-Hospedeiro (LIMHO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG na pessoa da Profa. Mila Fernandes Moreira Madeira e graduando Vinícius Martins Borges, os quais ensinaram e permitiram a realização dos testes microbiológicos. E também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ pela concessão da bolsa de Iniciação Científica Pibic pelo período de 12 meses de agosto de 2017 a julho de 2018.

RESUMO

A secreção lacrimal, muco e resíduos acumulados na superfície de uma prótese ocular podem propiciar o crescimento microbiano, incluindo a formação de biofilmes e surgimento de doenças como endoftalmites recorrentes. A resina acrílica atualmente é o material de escolha para a confecção dessas próteses. O controle de formação de biofilmes na superfície de uma prótese ocular é de extrema importância para a manutenção da saúde da cavidade anoftálmica de seus usuários. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano do tratamento por terapia fotodinâmica (TFD) sobre o biofilme de estafilococos desenvolvido na superfície de uma resina acrílica ocular escleral. Para isso foram confeccionados 66 discos de resina acrílica específica para prótese ocular (10 mm em diâmetro e 2 mm em espessura) e esterilizados com óxido de etileno. Para a avaliação microbiológica amostras de *Staphylococcus aureus* foram utilizadas e a cinética do biofilme foi avaliada ao final de 12h, 24h e 48 h. O biofilme foi formado sobre a superfície dos discos por 24 h e ao final os discos foram tratados com azul de metileno (AM) em diferentes concentrações de (25, 50, 75 ou 100 µg/mL), com ou sem fotoativação de laser diodo (TFD), controle positivo com gluconato de clorexidina 2%, e controle negativo com PBS. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por ANOVA e tukey ($\alpha = 0,05$). Pode-se verificar menores valores de UFC para os tratamentos com AM e TFD nas concentrações de 75 e 100 µg/mL, comparativamente às menores concentrações e ao controle negativo. Não houve crescimento bacteriano no controle positivo. Concluiu-se que a TFD foi eficaz no controle de biofilme de *S. aureus* formado sobre resina acrílica escleral, sendo este tratamento promissor como alternativa para controle químico de próteses oculares.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, biofilme, terapia fotodinâmica, prótese ocular, resina acrílica.

ABSTRACT

The lacrimal secretion, mucus and residues accumulated on the surface of an ocular prosthesis can promote microbial growth, including the formation of biofilms and the appearance of diseases such as recurrent endophthalmitis. Acrylic resin is currently the material of choice for making these prostheses. The control of formation of biofilms on the surface of an ocular prosthesis has extreme importance for the maintenance of the health of the anophthalmic cavity of its users. The objective of this study aimed to evaluate the antibacterial effect of photodynamic therapy (PDT) treatment on *Staphylococcus spp.* biofilm developed on the surface of an acrylic scleral ocular resin. For this, 66 disks of acrylic resin specific for ocular prosthesis (10 mm in diameter and 2 mm in thickness) and sterilized with ethylene oxide were made. For the microbiological evaluation, samples of *Staphylococcus aureus* were used and the biofilm kinetics was evaluated at the end of 12h, 24h and 48h. The biofilm was developed on the surface of the discs by 24 h and treated with methylene blue (MB) in different concentrations of (25, 50, 75 or 100 µg / mL) with or without diode laser photoactivation (PDT), positive control with 2% chlorhexidine gluconate and negative control with PBS. All data obtained in the study were submitted to statistical analysis by ANOVA and tukey ($\alpha = 0.05$). Lower CFU values can be verified for MB and PDT treatments at concentrations of 75 and 100 µg / mL, compared to the lowest concentrations and negative control group. There was no bacterial growth in the positive control. It was concluded that PDT was effective in the control of *S. aureus* biofilm formed on acrylic scleral resin, and this treatment is promising as an alternative for the chemical control of ocular prostheses.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm, photodynamic therapy, ocular prosthesis, acrylic resin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mm	= milímetro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}m)
mL	= mililitro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}L)
μL	= microlitro (unidade de medida equivalente a 10^{-6}L)
UFC/mL	= unidades formadoras de colônia por mililitro
Nm	= nanómetro
TFD	= Terapia Fotodinâmica
μg	= microgramas
AM	= Azul de Metileno
g	= grama
Ind. Com. Ltda.	= Indústria e Comércio limitada
$^{\circ}\text{C}$	= escala de grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Confeção dos discos de resina acrílica escleral.....	12
3.2 Cultivo bacteriano	13
3.3 Avaliação cinética do biofilme	13
3.4 Implantação do biofilme.....	14
3.5 Tratamentos de desinfecção.....	14
3.6 Contagem das células do biofilme	14
3.7 Análise estatística.....	15
4 RESULTADOS	16
5 DICUSSÃO	20
6 CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23
APÊNDICES	26

1 INTRODUÇÃO

As próteses oculares são um tratamento restaurador de extrema relevância para pacientes que foram submetidos à perda total ou parcial do globo ocular por neoplasias, traumas ou doenças congênitas (GOIATO et al., 2007). Assim este tratamento visa proporcionar a melhoria na qualidade de vida destes indivíduos (GOIATO et al., 2013; NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012; SONG; OH; BAEK, 2006), uma vez que os olhos além da visão, também desempenham um papel extremamente importante na comunicação e relacionamento humano. Além disso, o olho artificial permite o restabelecimento do contorno facial do paciente, devolve a harmonia e a estética facial, promove a sustentação e a tonicidade muscular e direciona o lacrimejamento, protegendo a cavidade anoftálmica (GOIATO et al., 2013; SONG, OH, BAEK, 2006).

Até a segunda Guerra Mundial os olhos artificiais eram confeccionados de vidro, tendo os alemães domínio desta técnica, porém, o vidro não adaptava-se corretamente à cavidade, além de quebrar e causar danos à região ocular, surgindo a necessidade de buscar materiais mais adequados. Diante disso, a resina acrílica foi descoberta e bem aceita para este fim, devido as suas vantagens sobre o vidro, como a disponibilidade no mercado, baixo custo, fácil manuseio, biocompatibilidade e um bom grau de resistência (ERPF; DIETZ; WIRTZ, 1947).

Entretanto, é conhecido que estes materiais biocompatíveis utilizados na confecção de próteses oculares, são susceptíveis à adesão bacteriana e colonização por microbiota potencialmente patogênica (PARANHOS et al., 2007). Entre os microrganismos colonizadores de próteses maxilofaciais e tecido remanescente encontram-se os estafilococos coagulase-positivos, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus*. (ARIANI et al., 2012; GUIOTTI et al., 2016).

O *S. aureus* vive, principalmente, nas superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos (PARANHOS et al. 2007). A secreção lacrimal, muco e resíduos acumulados na superfície da prótese podem tornar o ambiente excelente para o crescimento bacteriano (DAYAL; RAO; MAHAJAN, 1984), como o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria oportunista que coloniza a pele de 20% a 30% da população e é capaz de causar uma série de doenças e intoxicações no homem (KIM et al., 2015).

Assim, o controle de formação do biofilme nas próteses é muito importante para manter a saúde da cavidade anoftálmica e pode ser realizado por meio de técnicas de desinfecção e limpeza diárias (HENRIQUES et al., 2005). Os biofilmes são definidos como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias, e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001).

Estudos recentes mostram que a clorexidina é eficaz como anti-séptico químico, com ação antifúngica e bactericida (HENRIQUES et al., 2005; PARANHOS et al., 2007; SILVA et al., 2010). Entretanto, a literatura científica tem mostrado que o uso contínuo de soluções desinfetantes podem alterar propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012), como a lisura superficial, alterando a qualidade das próteses oculares. Por esse motivo, métodos alternativos e eficazes de desinfecção e esterilização de acrílico têm sido pesquisados (RIBEIRO et al., 2012).

A resina acrílica é um material termosensível e por isso não pode ser submetida a nenhum processo de esterelização envolvendo altas temperaturas, sendo necessária a sua desinfecção por métodos mais conservadores em relação a altas temperaturas. Neste contexto de tratamento, a terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo aplicada com bastante eficácia, e tem sido aplicada em parasitas patogênicos, na Odontologia nas áreas de periodontia, cardiologia, endodontia e patologia oral, em ambientes hospitalares e em lesões de pele, como o câncer de pele (RONQUI, 2015).

Além disso, a TFD consiste na interação de um agente corante fotossensibilizador e uma fonte de luz, como luz laser de baixa intensidade e LED, no intuito de provocar danos a membrana celular e morte bacteriana. Segundo O'riordan, Akilov e Hasan (2005) experiências usando fontes de luz e corantes datam de mais de 100 anos, essa ação ocorre quando os fotossensibilizadores absorvem os fótons da

fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado (NIRALE; THOMBRE; KUBASAD, 2012), gerando espécies reativas de oxigênio como, oxigênio singleto, que tem a capacidade de matar ou danificar as células bacterianas (GIROLDO et al., 2009). Entre os fotossensibilizadores mais utilizados na TFD, o azul de metileno (AM) destaca-se por ter boa absorção em diferentes substratos, com afinidade e comprimentos de onda maiores que 620 nm, sendo biocompatível e apresentando alto potencial antimicrobiano quando fotoativado. (PUPO et al., 2011; SILVA et al., 2010).

Desse modo, este estudo justifica-se pela necessidade de meios para desinfecção de próteses faciais, incluindo próteses oculares, visto que a TFD, tem se mostrado promissora no controle microbiológico. (DOVIGO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS-PONTES et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antibacteriana da TFD quanto ao biofilme de *Staphylococcus aureus*, desenvolvido na superfície de uma resina acrílica utilizada na confecção de prótese ocular.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar *in vitro* o comportamento do crescimento do biofilme na superfície de resina acrílica escleral.

- Avaliar *in vitro* a eficácia do tratamento com TFD, variando a concentração do AM, comparativamente à clorexidina e controle, na remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus*, na superfície de resina acrílica escleral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizada resina acrílica termopolimerizável em microondas, Onda-Cryl, (Clássico Artigos Odontológicos Ltda.). A partir disso, foram confeccionados 66 discos de resina acrílica que serviram como superfície para o desenvolvimento do biofilme bacteriano.

3.1. Confeção dos discos de resina acrílica escleral

Para a padronização dos discos de resina acrílica escleral obtidos pela Onda-Cryl (Clássico Artigos Odontológicos Ltda.), foi utilizada matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada, que corresponderam às dimensões dos discos de resina. Em uma mufla para micro-ondas, esta matriz foi posicionada entre duas placas de vidro (80 mm x 35 mm x 3 mm), sendo ambas isoladas com produto à base de alginato (Cel-Lack, Brasil), para que a resina acrílica não aderisse às placas de vidro após sua polimerização. Em seguida, as proporções do pó e polímero da resina acrílica foram previamente medidas em recipientes específicos, despejados e misturados em pote palador com espátula 36, de acordo com as instruções do fabricante. Quando a mistura chegou na fase filamentosa, esta foi inserida no interior da matriz metálica, a mufla foi fechada e o conjunto levado sob pressão de aprox. 40 libras² (Prensa). Em seguida, a pressão foi removida, a mufla foi parafusada com os discos confinados em seu interior e foi mantida em descanso durante 30 minutos para posterior polimerização da resina acrílica em micro-ondas. A polimerização no micro-ondas foi feita em 10 minutos, programada em três tempos, conforme indicação do fabricante (3 minutos em potência de 30% da capacidade máxima, 4 minutos em potência 0% e 3 minutos em potência de 60%). Após a polimerização, a mufla foi retirada do micro-ondas e deixada 24 horas esfriando para posterior abertura e retirada dos discos.

Posteriormente, todos os discos de resina acrílica escleral foram submetidos à limpeza em água filtrada para remoção de debris em sua superfície e, na sequência foram deixados ao ar livre, em ambiente asséptico, para secagem. Em seguida, os discos de resina acrílica foram esterilizados por óxido de etileno (WILLIANS et al.,

2011), pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, para eliminação de possíveis microrganismos remanescentes.

3.2. Cultivo bacteriano

A amostra de *S. aureus* (ATCC 6538) foi utilizada neste estudo. Para o preparo do inóculo, a amostra foi mantida a -80°C em caldo de criopreservação Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Sparks, MD, EUA) contendo 10% de glicerol. Para a reativação da amostra foram semeados 100 μL de *S. aureus* em uma placa de Petri contendo meio de cultura BHI, e incubadas a 37°C , em estufa bacteriológica, por 24 horas. As culturas foram inoculadas em um tubo *Falcon*TM contendo 30 ml de BHI incubadas a 37°C e mantidas sob agitação por 24 horas, a fim de obter células em fase exponencial. Após este período, a densidade óptica foi mensurada por um espectrofotômetro, a fim de estabelecer a absorbância de 0,5 a 620 nm, que equivale a 10^8 UFC/mL.

3.3. Avaliação cinética do biofilme

Foi verificada a capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno (SOUZA et al., 2014). Após o período de crescimento bacteriano, e verificação da absorbância, as células foram centrifugadas sob rotação de 4500 rpm por 6 minutos. O pellet bacteriano formado foi ressuspenso em caldo BHI enriquecido com 1% de sacarose, de forma a obter a concentração celular correspondente a 10^8 UFC/mL. Alíquotas de 200 μL da cultura bacteriana foram aplicadas em placas de 96 poços, e estas mesmas placas foram incubadas a 37°C por 12h, 24h e 48h.

Ao final de cada período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram gentilmente lavados três vezes com 200 μL de PBS estéril, e mantidas em temperatura ambiente até a completa secagem. O biofilme aderido à superfície da placa foi fixado com 300 μL de metanol (PA 99% v/v) por 10 minutos, e preservado adicionando-se 300 μL de PBS. Ao final de 48 h o biofilme de cada poço foi corado com solução de cristal violeta 0,5%. Após 10 minutos de coloração, a solução de corante foi aspirada, os poços foram lavados com PBS e o corante aderido ao biofilme foi removido pela adição de 200 μL de etanol absoluto por 10 minutos. Após esse período, 150 μL da solução contida em cada um dos poços foi transferida para outra placa limpa e seca. A absorbância foi quantificada utilizando

leitor de ELISA (Thermo Fisher Scientific, EUA), em comprimento de onda de 620 nm.

3.4 Implantação do biofilme

Em fluxo laminar, os discos de resina foram retirados do envelope de esterilização com o auxílio de uma pinça estéril e, sob condições assépticas, transferidos individualmente, na posição horizontal para uma placa de cultura de 24 poços contendo 800 µL de inóculo bacteriano, correspondente a 10^8 UFC/mL de *S. aureus* em BHI suplementado com 1% de sacarose. Verificou-se que 800 µL é volume necessário até cobrir o disco por completo apresentando adesão de biofilme viável para os testes. As placas contendo os discos com o inóculo foram incubadas a 37°C, durante 24 horas sem agitação. Em seguida, os discos foram transferidos para uma nova placa de cultura de 24 poços contendo 800µl de PBS para lavagem. Posteriormente, a solução foi aspirada e os discos foram submetidos aos respectivos tratamentos de desinfecção propostos no estudo.

3.5 Tratamentos de desinfecção

Após o período de incubação de 24 horas, os discos de resina seguiram imediatamente ao tratamento com as soluções proposta: solução de AM (fotossensibilizador) nas concentrações de 25, 50, 75 ou 100 µg/mL no período de 5 min sem fotoativar com laser; solução de AM nas concentrações de 25, 50, 75 ou 100 µg/mL no período de 5 min fotoativados com laser diodo (comprimento de onda: 660 nm; energia: 9J- 1J = 1J/25cm² (Therapy EC); potência: 100mW) durante 90 segs.; solução de gluconato de clorexidina a 2% (CHX) por 10 minutos como controle positivo; PBS por 10 minutos como controle negativo; aplicação apenas de laser diodo (comprimento de onda: 660 nm; energia: 9J- 1J = 1J/25cm² (Therapy EC); potência: 100mW) durante 90 segs. Todos os grupos experimentais permaneceram com 6 discos (n = 6).

3.6 Contagem das células do biofilme

Ao final dos tratamentos, as soluções foram cuidadosamente aspiradas, adicionado 800 µL de PBS aos poços para lavagem dos discos contendo o biofilme e posterior remoção das células fracamente aderidas. As soluções de PBS das placas

foram aspiradas para remoção dos excessos dos produtos e adicionado à placa 100 µL de PBS contendo 0,005% de solução Tween para impedir o escoamento do PBS. Após, foi realizada a raspagem do biofilme formado sobre os discos utilizando ponteira estéril. As suspensões contendo o biofilme foram homogeneizadas e diluídas em série em 90 µL de solução PBS para cada 10 µL de amostra. Para a semeadura da diluição em série foi aplicada a técnica de microgota (ROMEIRO, 2008). Assim, cada placa de Petri correspondeu a um grupo de tratamento, sendo dividida em cinco sessões identificadas por diluição: 10^{-2} a 10^{-6} . Para cada diluição foram aplicadas 3 gotas de 10 µL cada retiradas das suspensões diluídas. As placas de petri foram incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica (Incubadora BOD, CIENLAB, Brasil), ambiente de aerobiose por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi obtido a partir da média entre a contagem das colônias das 3 gotas para cada diluição, multiplicado por um fator de correção (devido aos 10 µL de cada gota) e pelo inverso da diluição.

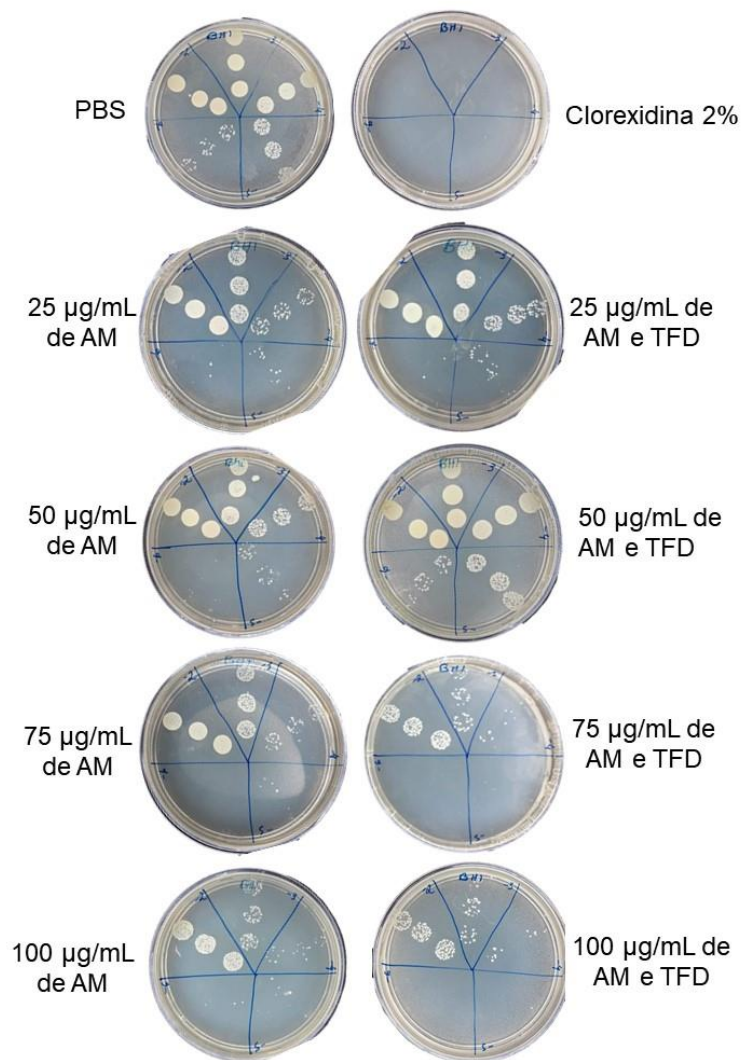
3.7. Análise Estatística

Os dados foram analisados com o software Minitab (versão 17). A transformação Box-Cox foi utilizada para a obtenção de dados em acordo com a distribuição normal para o teste de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0.05$). A transformação indicou que a função logarítmica natural (ln) aplicada aos dados atende aos pressupostos da Análise de Variância (ANOVA). A Análise de Variância (ANOVA) três-fatores foi realizada para verificar a diferença significativa entre os fatores analisados: AM, concentração e TFD. As diferenças significativas nos valores obtidos na nested-ANOVA foram comparados por teste de Tukey-Kramer HSD em nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

Os discos de resina tratados com CHX-controle positivo não apresentaram crescimento para a amostra de *S. aureus*, havendo completa inibição. Assim, como o valor numérico foi zero referente ao tratamento de CHX, estes resultados não foram considerados na nested-ANOVA. A figura 1 apresenta as placas de Petri para contagem de UFC dos tratamentos, sendo visível menor presença de UFCs para todos os tratamentos propostos em relação ao controle PBS.

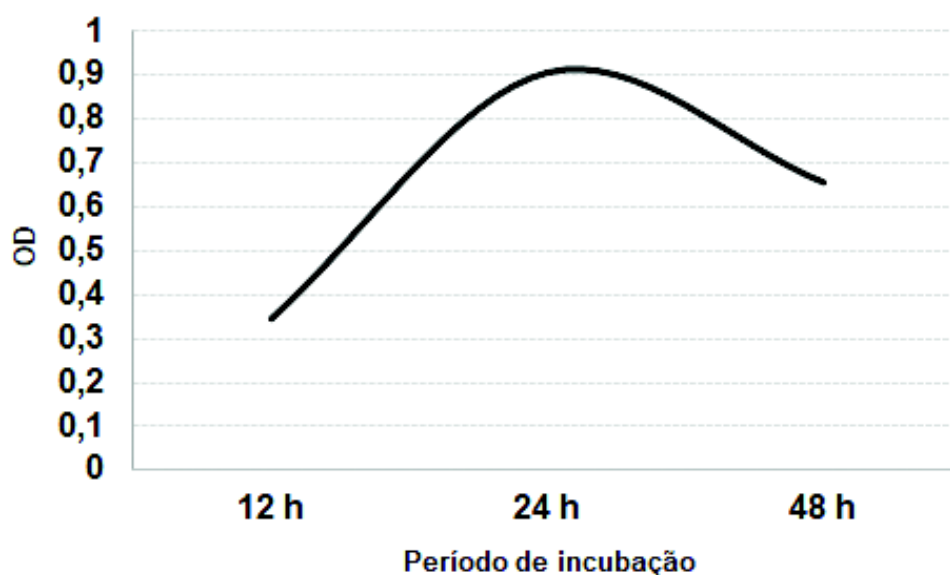
FIGURA 1. Placas Petri após incubação a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias formadas por mililitro.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Na avaliação cinética pode-se verificar crescimento do biofilme de *S. aureus* seguindo normalmente as fases: log (exponencial), estacionária e de declínio, sendo a escolha do período de 24 horas de incubação ideal para o estudo (Figura 2).

FIGURA 2. Valores médios de OD do crescimento do biofilme de *S. aureus*. Fase log (exponencial) em 12 h, fase estacionária em 24 h, e fase de declínio em 48 h.



Fonte: Arquivo Pessoal.

No teste ANOVA, pode-se verificar diferença para todos os tratamentos (AM, TFD e concentração) e a interação entre estes fatores ($P < 0,001$) (tabela 1).

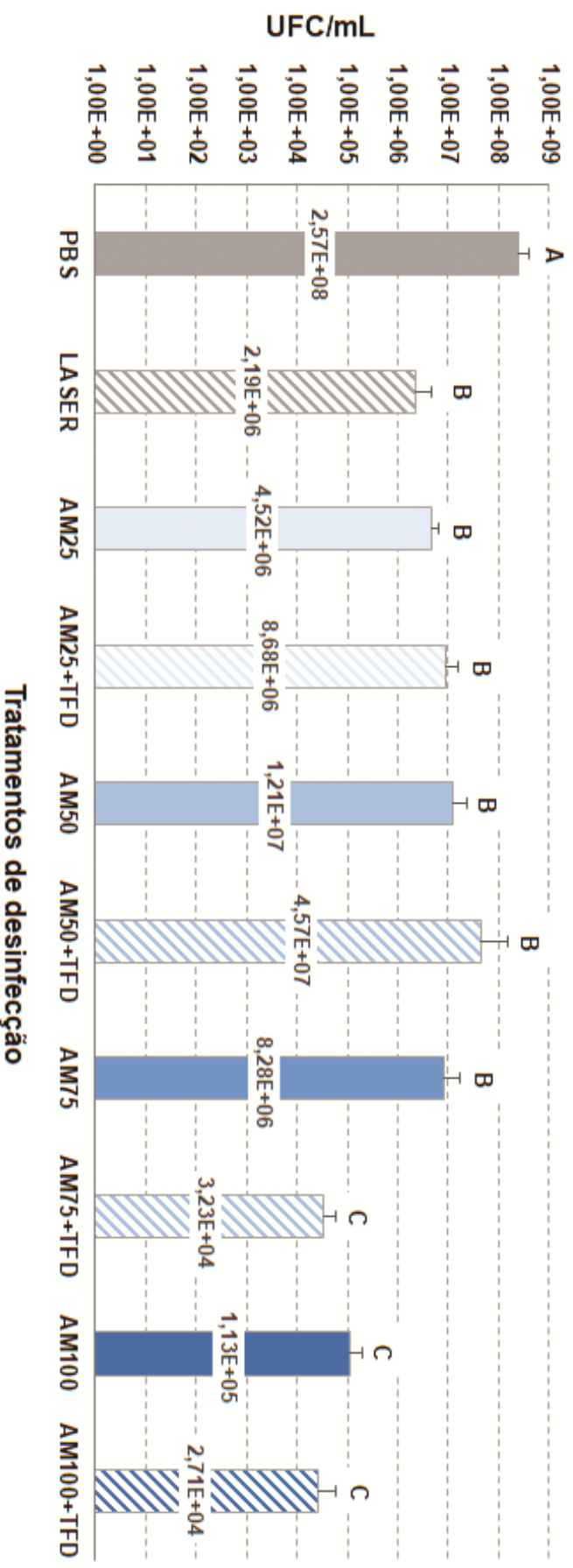
Tabela 1. Resultados de ANOVA-nested três fatores para log de UFC/mL.

Fator de variação	gl	SQ Ajustada	MQ Ajustada	F	P
AM	1	97,50	97,499	68,94	<0,001*
TFD	1	109,80	109,877	77,69	<0,001*
AM × TFD	1	24,99	24,994	17,67	<0,001*
Concentração (AM; TFD)	6	251,12	41,854	29,59	<0,001*
Erro	50	70,72	1,414		
Total	59	531,82			

* $P < 0,05$ apresenta diferença estatística significativa.

Os valores médios e o desvio padrão da contagem de UFC para cada tratamento de desinfecção, são apresentados na figura 3. Pode-se verificar entre os tratamentos, menor número de UFC para os discos de resina tratados com AM75+TFD (UFC=3,23E+04) e AM100 sem e com TFD (UFC=1,13E+05; 2,71+04), com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$), em relação ao PBS-controle negativo (UFC=2,57E+08), e demais tratamentos. Além disso, os discos tratados com os demais tratamentos: incluindo apenas o laser diodo, e AM nas concentrações de 25 e 50 com e sem TFD, e 75 sem TFD apresentaram menor número de UFCs, estatisticamente significativa ($P < 0,001$) em relação ao PBS.

FIGURA 3. Média e desvio padrão do número de células aderidas do biofilme de *S. aureus* (ATCC 6538) por mL para cada tratamento de desinfecção. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,001$; nested-ANOVA).



Fonte: Arquivo Pessoal.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo rejeitaram a hipótese nula, pois houve diferença estatística significativa entre todos os fatores avaliados (AM, TFD e concentração) (ANOVA, $P < 0,05$). O agente químico digluconato de clorexidina 2% utilizado no estudo, devido a sua eficácia antimicrobiana reconhecida (DA SILVA *et al.*, 2008) apresentou amplo espectro na inibição do desenvolvimento de biofilme da amostra de *S. aureus*. A imersão em clorexidina comprovou sua eficácia antimicrobiana diante da carga de microorganismos presente na superfície dos discos de resina acrílica, comprovado na (figura 1), a qual mostra nenhum crescimento de *S. aureus*. Estudos prévios confirmam esta tese de que a utilização da clorexidina 2% por 10 minutos, é efetiva na redução de certos microrganismos, como *Staphylococcus aureus* (GUIOTTI, 2016). Entretanto, o uso frequente pode ocasionar, em longo prazo, alterações das propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica e causar manchamento da base de uma prótese dentária e comprometer a estética da calota ocular com a conseqüente diminuição da qualidade do material (GANASHI *et al.*, 2013; SALVIA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2010).

Neste contexto, métodos alternativos e eficazes para desinfecção ou esterilização de materiais restauradores odontológicos têm sido pesquisados (RIBEIRO *et al.*, 2012). O tratamento apenas com laser e a associação da luz com o fotossensibilizador apresentara efeito antimicrobiano, pois houve menor redução significativa de UFC/mL comparada ao controle (figura 3). Os discos somente irradiados, apresentaram diferença estatística significativa, em relação ao grupo controle, corroborando resultado de Suarez *et al.* (2013) que mostrou que o laser é capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana.

Em nosso estudo foi testado a TFD mediada pelo fotossensibilizador AM, apresentando redução efetiva da atividade antimicrobiana comparativamente ao grupo controle, e corroborando resultados de um estudo anterior (KOMINE; TSUJIMOTO, 2013). Ainda, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que quando o AM foi utilizado isoladamente como tratamento nas concentrações de 25, 50 µg/mL não apresentou menor redução de UFC/mL significativamente quando comparado ao uso de TFD. Adicionalmente, pode-se verificar redução significativa de UFC/mL na concentração de 75 µg/mL (Figura 3). Este resultado pode indicar

que o AM em menores concentrações pode não ter efeito citotóxico significativo sobre o microorganismo testado, *S. aureus*, em acordo com os achados de Pupo et al. (2011), que verificou diferença significativa entre as concentrações de AM e maior espectro microbiológico em maiores concentrações.

Em destaque neste estudo pode-se verificar que o uso da TFD aumentou o efeito inibitório do AM nas concentrações de 75 e 100 µg/mL (figura 3), corroborando estudos que mostram que o uso do laser associado a um fotossensibilizador é eficaz contra vários microrganismos (GARCEZ et al., 2010; MIRANDA et al., 2013; PINHEIRO et al.; 2009). De acordo com Giroldo et al. (2009) após a irradiação, o AM pode levar a produção de oxigênio singleto citotóxico e outras espécies reativas de oxigênio, que podem danificar a membrana celular e promover a morte da célula. A TFD não foi eficaz em reduzir completamente os microrganismos do biofilme avaliado, mas os resultados obtidos neste estudo foram capaz de comprovar redução significativa da viabilidade celular bacteriana na área de alcance do laser, diante dos parâmetros testados.

Como limitações deste estudo, pode-se ressaltar resultados encorajadores da associação de AM ao laser, sendo a TFD aplicada. Algumas limitações foram observadas durante a realização deste estudo, como o design do aparelho laser, que não permitiu abranger todas as áreas do disco de resina acrílica igualmente. Além disso, acredita-se que a concentração, o tipo de fotossensibilizador, o tempo de exposição e a densidade de energia do laser também podem influenciar os resultados da TFD (PUPO et al.; 2011). Diante disso novos estudos devem ser realizados a fim de aperfeiçoar esse dispositivo de luz e torná-lo prático e preciso para ser usado pelos cirurgiões-dentistas. Ainda sugere-se testes com novos tempos de irradiação, fontes de luz com comprimentos de onda diferentes e utilizando outras classes de fotossensibilizadores tanto já existentes quanto desconhecidas. Portanto, mais estudos são necessários para confirmar a eficácia dos fotossensibilizadores e tornar sua aplicação clínica acessível e uma alternativa real ao tratamento da microbiota desenvolvida na superfície de próteses faciais e oculares.

6 CONCLUSÕES

- O gluconato de clorexidina a 2 % apresentou amplo espectro na remoção do biofilme de *S. aureus*, com erradicação de UFCs.
- Houve diminuição dos valores de UFC para todos tratamentos propostos no estudo em relação ao controle PBS, incluindo o AM.
- O AM e TFD na concentração de 100 µg/mL apresentou maior eficácia no controle de biofilme de *S. aureus* formado sobre resina acrílica escleral, comparativamente aos demais tratamentos e grupo controle PBS.

REFERÊNCIAS

1. ARIANI, N. et al. Microbial biofilms on facial prostheses. **Biofouling**, v. 28, n. 6, p. 583-591, 2012.
2. CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic** (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica). Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-4.
3. DA SILVA, F. C. et al. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylicresin. **Journal of Prosthodontics**, v. 17, p. 627-633, 2008.
4. AYAL, Y.; RAO, S. S.; MAHAJAN, V. M. Comparative study of bacterial and fungal floras of contracted sockets and fellow eyes. **Annals of Ophthalmology**, v. 16, n. 2, p. 154, 156, 158 passim, Feb. 1984. ISSN 0003-4886
5. DOLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.** 2002;15(2):167-93.
6. DOLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin Infect Dis.** 2001;33(8):1387-92.
7. DOVIGO, L. N. et al. Photodynamic inactivation of four cândida species induced by photogem®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 42-49, 2010.
8. ERPF, S. F.; DIETZ, V. H.; WIRTZ, M. S. Ofthalmo-prosthesis U.S. **Army World War II. Surgery**, v. 101, p. 405-8, 1947.
9. FREITAS-PONTES, K. M. et al. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 112, p. 632-637, 2014.
10. GANASHI, S. et al. Comparative Study to Assess the Effectiveness of Various Disinfectants on two Microorganisms and the effect of same on Flexural Strength of Acrylic Denture Base Resin - An In Vitro Study. **Journal of International Oral Health**, v. 5, p. 55-62, 2013.
11. GARCEZ, A. S. et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1463-6, 2010.

12. GIROLDO, L. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 109-112, 2009.
13. GOIATO, M. C. et al. Positioning magnets on a multiple/sectional maxillofacial prosthesis. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 8, n. 7, p. 101-7, 2007.
14. GOIATO, M. C. et al. Psychosocial impact on anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 1, p. 113-9, 2013.
15. GUIOTTI, A.M. et al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 116, n. 1, p. 136-43, 2016.
16. HENRIQUES, M. et al. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to silicone-hydrogel contact lenses. **Optometry and Vision Science**, v. 82, n. 6, p. 446-50, 2005.
17. KIM, N. J. et al. Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages. **Molecular Immunology**, v. 65, p. 17-24, 2015.
18. KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of single toxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 411-4, 2013.
19. NIRALE, R. M.; THOMBRE, R.; KUBASAD, G. Comparative evaluation of sodium hypochlorite and microwave disinfection on dimensional stability of denture bases. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 4, p. 24-29, 2012.
20. O'RIORDAN, K.; AKILOV, O. E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 247-262, 2005.
21. PARANHOS, R. M. et al. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 1, p. 33-8, 2007.
22. PINHEIRO, S. L. et al. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 521-6, 2009.

23. PUPO, Y. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as 42 photosensitizing dyes. Dentistry School, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 24, n. 2, p. 188-9, 2011.
24. RIBEIRO, D. G. et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 161-168, 2012.
25. ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. **Bactérias fitopatogênicas**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2008.
26. RONQUI, M. R. **Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e *Escheria coli***. 2015. 142f. (Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2015.
27. SALVIA, A. C. R. et al. Disinfection protocols to prevent cross-contamination between dental offices and prosthetic laboratories. **Journal of Infection and Public Health**, v. 6, p. 377-382, 2013.
28. SILVA, M. C. V. S. et al. Evaluation of the biosecurity measures adopted in dental prosthesis laboratories of the city of João Pessoa, PB, Brazil. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 10, p. 101-106, 2010.
29. SONG, J. S.; OH, J.; BAEK, S. H. A survey of satisfaction in anophthalmic patients wearing Ocular prosthesis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 244, n. 3, p. 330-5, 2006.
30. SOUZA, E. L. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 67-75, 2014.
31. SUAREZ, F. et al. Implant Surface Detoxication: A Comprehensive Review. **Implant Dentistry**, v. 22, n. 5, p. 465-73, 2013.
32. WILLIAMS, D. W. et al. Microbial contamination of removable prosthodontics appliances from laboratories and impact of clinical storage. **British Dental Journal**, v. 2011, p. 163-166, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Materiais e equipamentos utilizados no estudo.

FIGURA 1. Resina acrílica: polímero termopolimerizável N1 e monômero Onda-Cryll (Clássico Artigos Odontológicos Ltda.).



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 2. Discos de resina acrílica estéreis por óxido de etileno.



FONTE: Arquivo pessoal

FIGURA 3. Amostra de *S. aureus* (ATCC 6538).



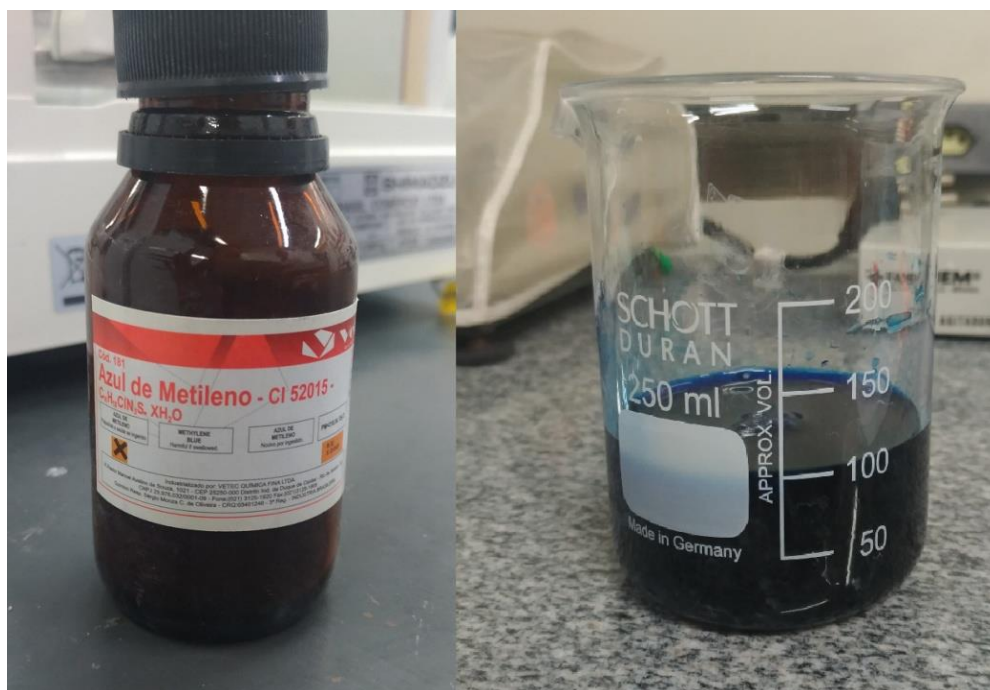
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 4. Gluconato de clorexidina (Concentração de 2%, Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A).



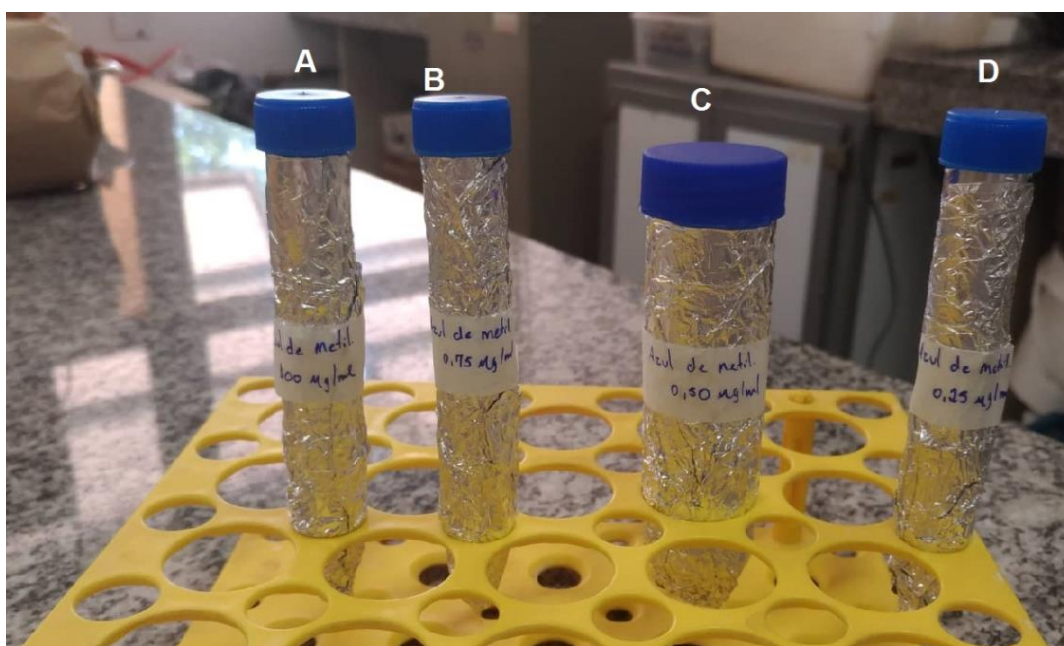
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 5. Azul de metileno (pó) (VetecQuimica Fina Ltda.) e solução diluída em água pura estéril.



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 6. Soluções de azul de metileno: 100 μ g/mL (A); 75 μ g/mL (B); 50 μ g/mL (C); 25 μ g/mL (D).



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 7. Espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific).



FONTE: Arquivo pessoal.

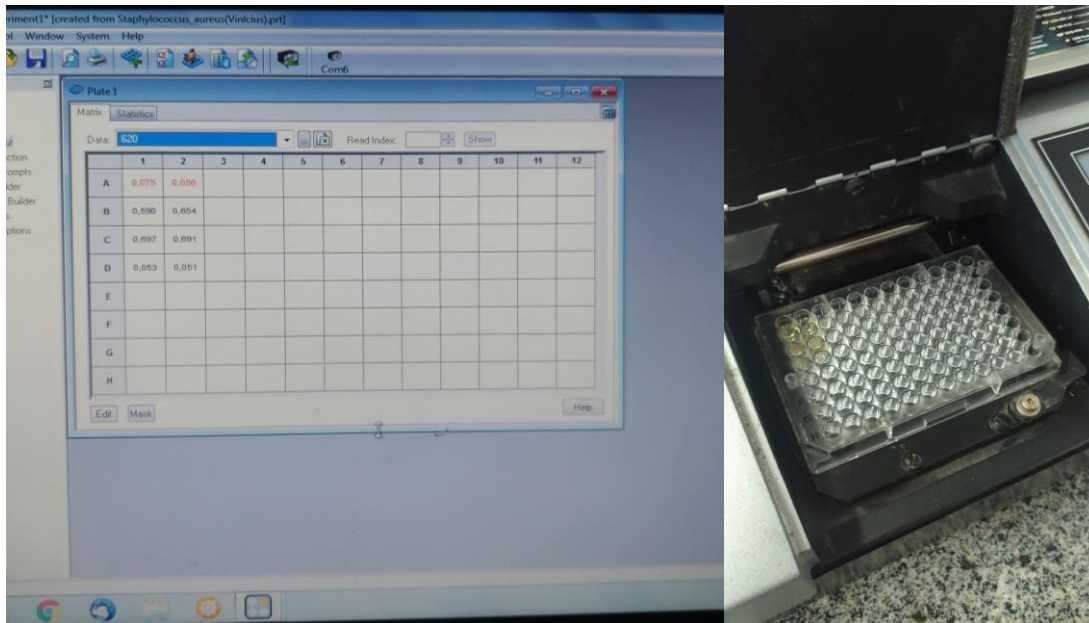
FIGURA 8. Laser diodo (THERAPY EC).



FONTE: Arquivo pessoal.

APÊNDICE B - Cultura, desenvolvimento do biofilme e contagem das unidades formadoras de colônias.

FIGURA 9. Avaliação cinética do biofilme no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific).



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 10. Inóculo bacteriano de *S. aureus*.



FONTE: Arquivo pessoal

FIGURA 11. Pellet bacteriano em tubo *Falcon*TM.



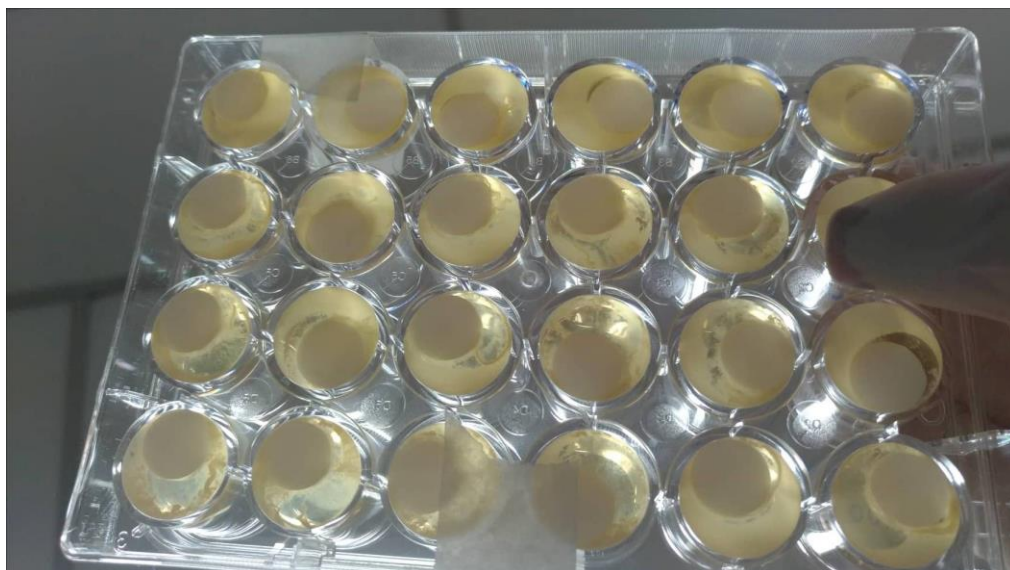
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 12. Placa de 24 poços com discos de resina imersos em caldo BHI suplementado com 1% de sacarose, com *S. aureus*, na concentração de 10^8 células/mL (DO 620nm=0,5).



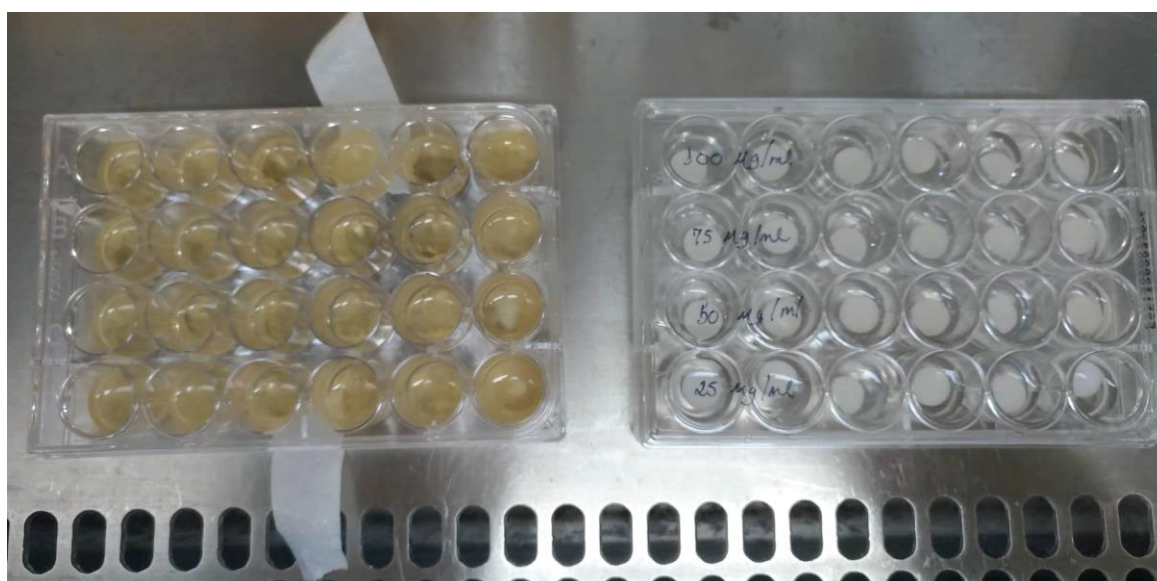
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 13. Placa de 24 poços contendo os discos de resina com o biofilme formado sobre a superfície destes, após 24 horas de incubação a 37°C.



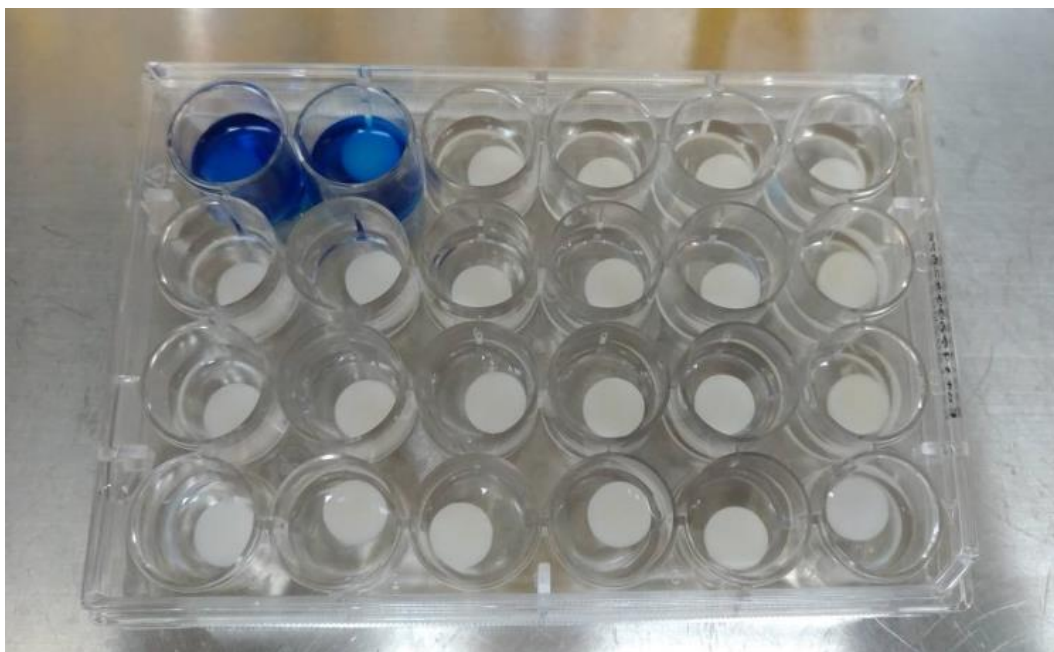
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 14. Transferência dos discos de resina para uma nova placa 24 poços, para lavagem com PBS.



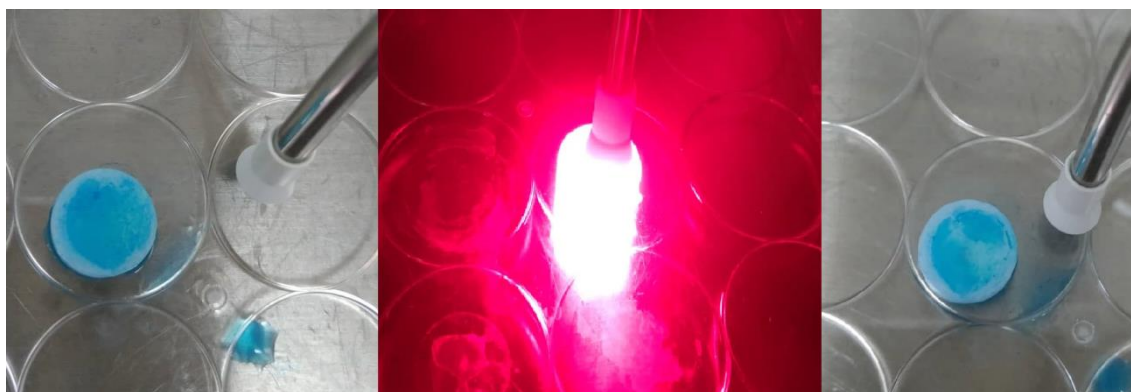
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 15. Discos de resina na placa 24 poços e tratamento realizado com as soluções preparadas de azul de metileno.



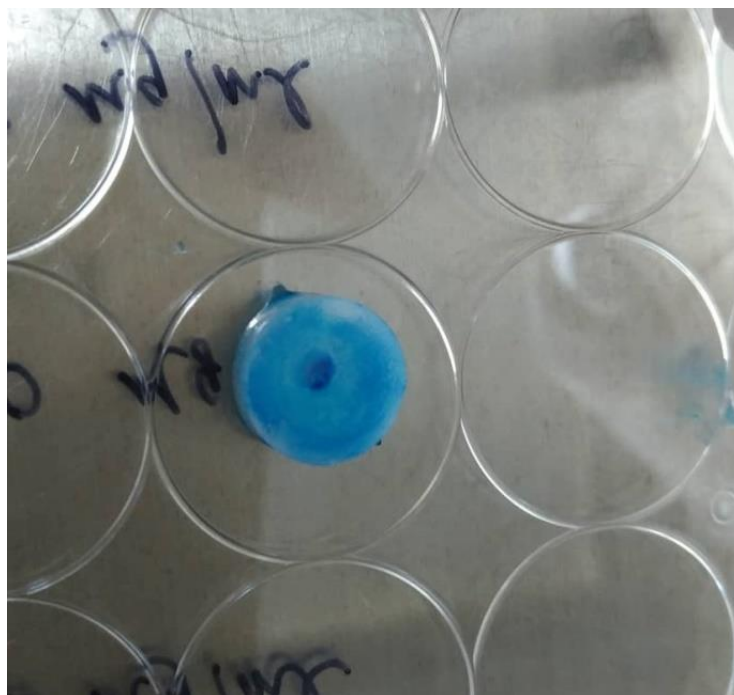
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 16. Procedimento de aplicação de PDT sobre os discos de resina.



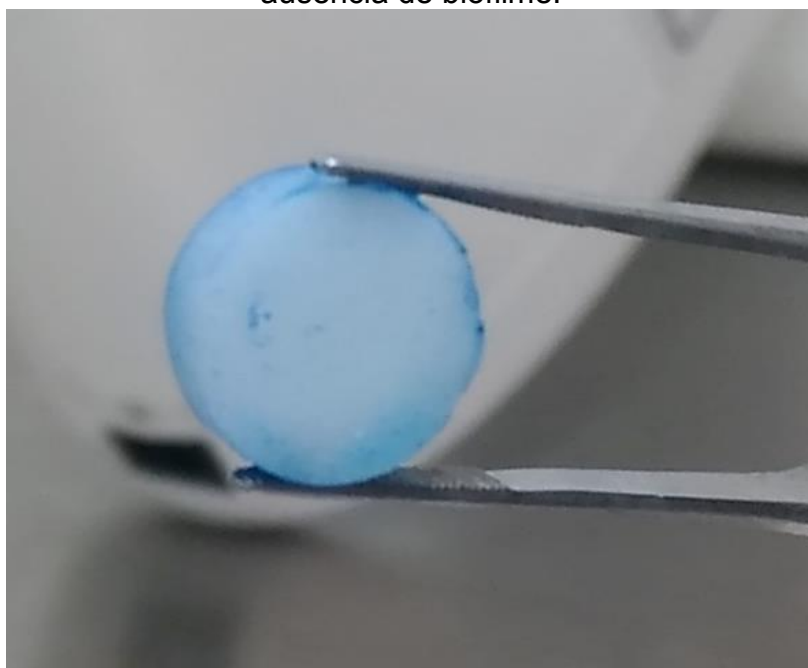
FONTE: Arquivo pessoal

FIGURA 17. Formação de halo no disco de resina tratado com azul de metileno, imediatamente após a aplicação do laser diodo.



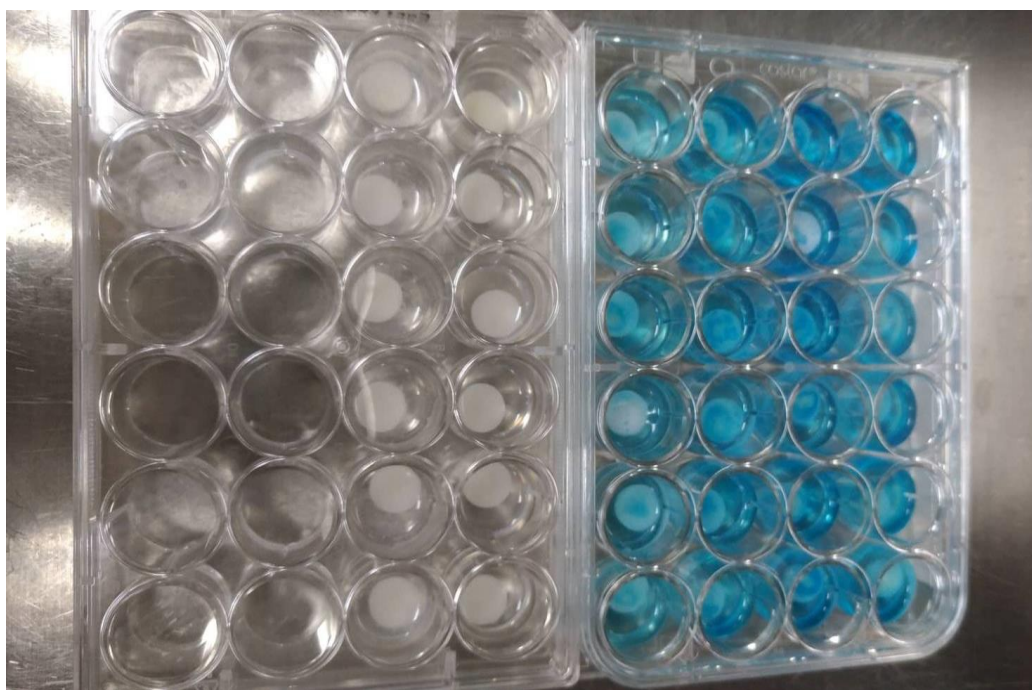
FONTE: Arquivo pessoal

FIGURA 18. Visualização da área não corada por azul de metileno devido à ausência de biofilme.



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 19. Placas de 24 poços contendo os discos de resina tratados com clorexidina e soluções de azul de metileno após lavagem em PBS.



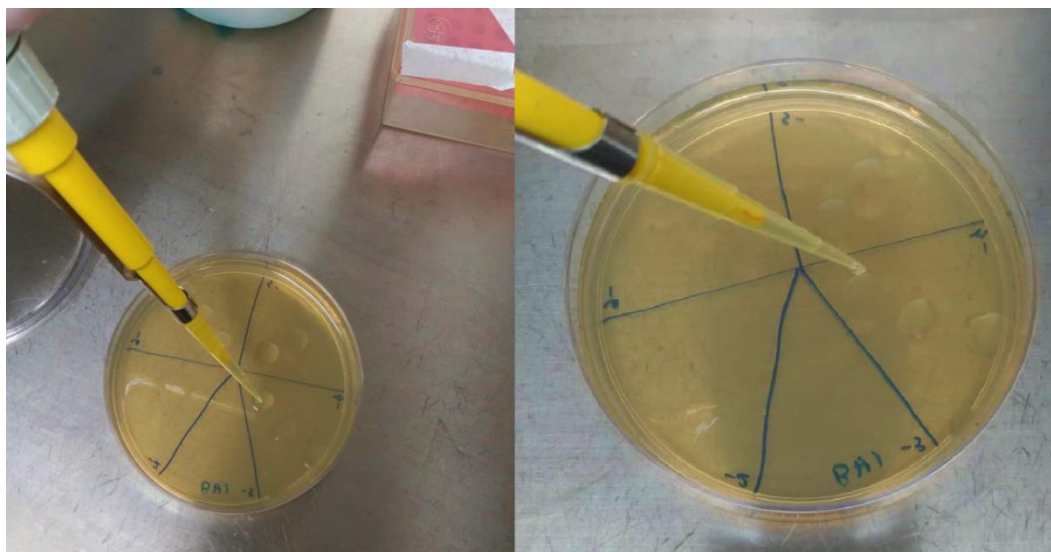
FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 20. Procedimento de diluição seriada.



FONTE: Arquivo pessoal.

FIGURA 21. Aplicação da técnica da microgota para a contagem de células por mililitro.



FONTE: Arquivo pessoal.