

EFICIÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM ANTIBIÓTICO FOTOSSENSÍVEL DE DUPLO MECANISMO PARA CONTROLE DE BIOFILMES EM IMPLANTES DENTÁRIOS

Palavras-Chave: implantes dentários, titânio, demeclociclina, terapia fotodinâmica

Autores:

Isabelli Freire **Stella**, FOP - UNICAMP

Samuel Santana **Malheiros**, FOP - UNICAMP

Maria Helena Rossy **Borges**, FOP – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Bruna Egumi **Nagay** (coorientadora), FOP - UNICAMP

Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo **Barão** (orientador), FOP - UNICAMP

1. Introdução

Os implantes de titânio são amplamente empregados na reabilitação de pacientes edêntulos, mas apresentam superfícies que favorecem colonização microbiana e formação de biofilmes, levando ao desenvolvimento de infecções peri-implantares, associada à falha do implante em até 40% dos casos.¹ Dada a complexidade biológica desses processos infecciosos e a geometria dos implantes, persiste a ausência de consenso sobre a estratégia terapêutica ideal.² Nesse cenário, as abordagens não cirúrgicas adjuvantes têm ganhado ênfase, em especial a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa)³, que combina luz visível, oxigênio e um fotossensibilizador para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) capazes de oxidar simultaneamente múltiplos alvos microbianos.⁴ Entretanto, os fotossensibilizadores convencionais carecem de ação microbicida intrínseca, limitando sua eficácia ao período de irradiação e demandando múltiplos ciclos.⁵

Nesse contexto, um agente que una potente atividade antimicrobiana própria e capacidade fotossensibilizadora se mostra ideal. A demeclociclina (DMC), antibiótico da classe das tetraciclina, inibe a síntese proteica ao se ligar à subunidade 30S do ribossomo, resultando em efeito bacteriostático.⁶ Além disso, quando excitada por luz azul (~415 nm), a DMC gera ERO com comprovada eficácia fotodinâmica *in vitro* e *in vivo*.^{7,8} Apesar dessas propriedades promissoras, a aplicação da DMC em TFDa para infecções peri-implantares ainda não foi explorada. Portanto, este estudo objetivou investigar o potencial da DMC contra biofilmes polimicrobianos peri-implantares, por meio de sua caracterização óptica e da avaliação de sua atividade antimicrobiana em condição de irradiação luminosa ou não.

2. Metodologia

2.1 Preparação dos discos de Ticp

O delineamento experimental adotado neste estudo encontra-se esquematizado na Figura 1. Discos de titânio comercialmente puro (Ticp) foram polidos em politriz automática sob irrigação contínua, utilizando-se lixa metalográfica #320. Na sequência, fez-se limpeza ultrassônica em álcool isopropílico 70 %, acetona e água destilada (10 min), seguida de secagem.⁹

2.2 Determinação de CIM e CBM da DMC

Amostras de saliva foram coletadas de voluntários saudáveis em jejum de 2 h e sem uso de antibióticos, antifúngicos ou antissépticos bucais nos 3 meses anteriores, conforme aprovação pelo Comitê de Ética da FOP/UNICAMP (CAAE: 74390923.7.0000.5418). A saliva coletada (inóculo microbiano) foi diluída em meio fluido universal modificado (mFUM) suplementado com 10 % de BHI e 10% de sacarose. O inóculo foi ajustado com $OD_{550} = 0,1 \pm 0,02$ ($\approx 10^7$ células/mL) em espectrofotômetro, e, em seguida, a suspensão foi adicionada em placas de 96 poços contendo concentrações crescentes de DMC (0–10.000 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich). Após incubação de 24 h a 37 °C com 5% CO_2 , 10 μL de cada poço ($n=3/\text{grupo}$) foi semeado em meio de cultura Columbia Blood Agar acrescido de 5 % de sangue de carneiro e incubados por 3 dias a 37 °C. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento e a CBM como a menor concentração sem crescimento bacteriano.

2.3 Perfil de absorção UV-Vis e Ensaio Fotodinâmico

O espectro de absorção da DMC (500 $\mu\text{g/mL}$) foi obtido por espectrofotometria UV-Vis na faixa de 430–490 nm. Para avaliar o potencial fotodinâmico, preparou-se mistura de DMC (500 $\mu\text{g/mL}$) e azul de metileno (10 $\mu\text{mol/L}$) em placas de 24 poços ($n=3/\text{grupo}$), submetendo-a luz LED (~450 nm) por intervalos de 5 min até 4 h, com grupo escuro como controle. A atividade fotodinâmica foi quantificada pela variação de absorbância segundo metodologia adaptada.⁹

2.4 Ensaio microbiológico

2.4.1 Formação da película salivar e Formação do Biofilme

Os discos de Ticp estéreis foram imersos em saliva centrifugada e filtrada (0,22 μm) por 30 min a 37 °C sob agitação (60 rpm) (Cordeiro et al., 2018; Pantaroto et al., 2018). Discos com película salivar foram distribuídos em placas de 24 poços contendo 100 μL de saliva não filtrada e 900 μL de mFUM suplementado com 10 % de BHI e 10 % de sacarose e incubadas por 24 h a 37 °C em 10 % CO_2 . Em seguida, realizou-se lavagem com NaCl 0,9 % para remover células não aderidas e adicionou-se meio mFUM fresco. Após mais 24 h de incubação, procedeu-se a nova lavagem e transferência dos discos para placas limpas de 24 poços, em que cada poço recebeu 900 μL de mFUM fresco e 100 μL de novo inóculo de saliva humana padronizada. As amostras foram então incubadas sob rigorosas condições anaeróbicas (10 % H_2 , 5 % CO_2 , 85 % N_2) a 37 °C por mais 48 h, favorecendo especificamente o desenvolvimento de bactérias anaeróbias.¹⁰

2.4.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

Biofilmes formados foram tratados com 1 mL de DMC a 500 $\mu\text{g/mL}$ (com DMC) ou 1 mL de NaCl 0.9% estéril (controle negativo) e pré-incubados por 15 min em ambiente escuro (papel-alumínio). Metade das amostras foi exposta à luz azul (~500 nm) por 30 min (com luz) e a outra metade permaneceu em escuro como controle (sem luz), isolando o efeito do fotossensibilizador.

2.5.3 Avaliação de Viabilidade e Morfologia do Biofilme

Após o tratamento, os discos foram transferidos para 1 mL de NaCl 0,9 % e submetidos à sonicação (7 W, 30 s). As suspensões foram diluídas seriadamente, semeadas em duplicata em CBA + 5 % sangue de carneiro e incubadas 48 h a 37 °C/10 % CO_2 . As UFC ($n = 6/\text{grupo}$) foram contadas em estereomicroscópio e expressas como \log_{10} UFC/mL. Para MEV, biofilmes ($n = 1/\text{grupo}$) foram fixados

em glutaraldeído 2,5 % (2 h), desidratados em etanol (50–100 %), secos ao ar, metalizados com ouro e analisados em JEOL JSM-5600LV (15 kV).⁹

2.5 Análise estatística e apresentação dos dados

Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Shapiro–Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). Para o ensaio fotodinâmico aplicou-se teste t de Student; para os ensaios microbiológicos, ANOVA de dois fatores (antibiótico × luz) com pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

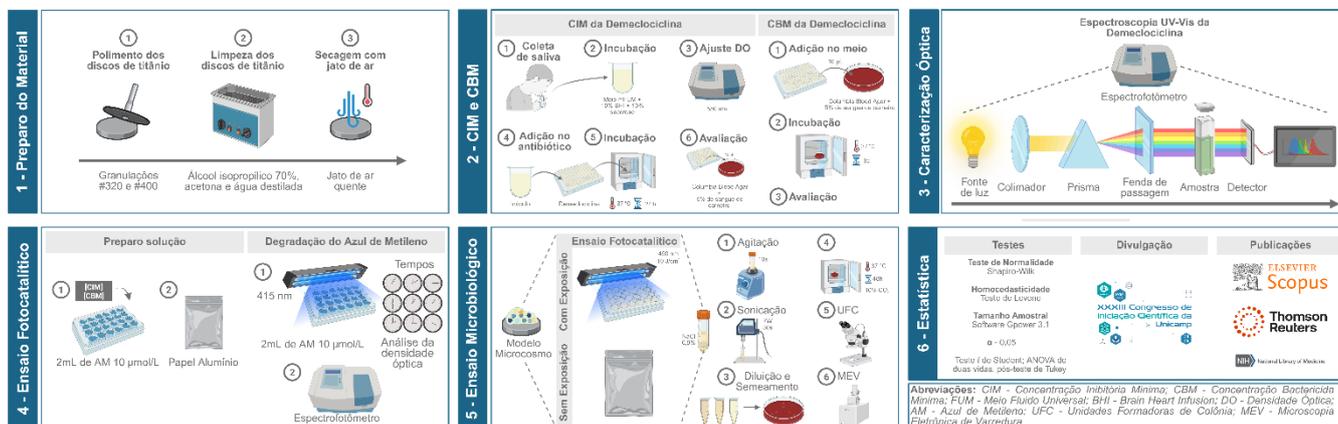


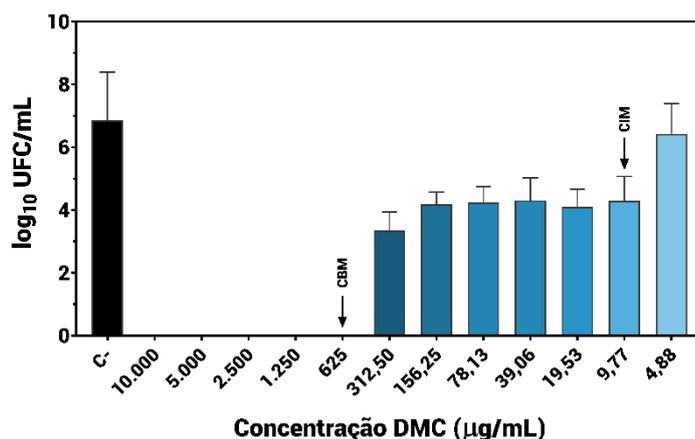
Figura 1. Delineamento Experimental.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de CIM e CBM da DMC

Os ensaios de CIM e CBM revelaram que na concentração de 4,88 µg/mL observou-se crescimento superior ao inóculo inicial, caracterizando concentração subinibitória sem impacto relevante nos mecanismos de proliferação bacteriana (Figura 2). Entre 39,06 e 312,5 µg/mL, os níveis de UFC mantiveram-se estáveis em relação ao controle inicial, evidenciando ação bacteriostática da DMC. Em concentração de 625 µg/mL, não foi observado qualquer desenvolvimento de colônias após 48 h de cultivo em CBA, confirmando efeito bactericida total. Optou-se por 500 µg/mL nos experimentos subsequentes por estar imediatamente abaixo da CBM, garantindo inibição substancial sem provocar erradicação completa, o que possibilita investigar o potencial fotodinâmico da DMC em condições de respostas subletais à ativação luminosa.

Figura 2. Quantificação da viabilidade bacteriana (\log_{10} UFC/mL) em função da concentração de DMC para determinação de CIM e CBM. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão ($n = 3$).



3.2. Caracterização óptica e fotodinâmica

Na Fig. 3A, o espectro de absorção da DMC revelou banda Soret de 0,25 u.a. a 450 nm, coincidente com o comprimento de onda da fonte azul e indicando captação óptica eficiente. A conjugação π da estrutura tetracíclica potencializa reações fotoinduzidas essenciais ao seu mecanismo fotodinâmico.^{4,11} Em ensaios fotodinâmicos, a degradação do AM atingiu 16,23 % ($\pm 1,89$) após 30 min de irradiação, significativamente superior ao controle escuro (3,66 % $\pm 1,03$; $p = 0,0005$), comprovando a dependência luminosa da DMC. No estado excitado, a DMC gera ERO por meio de reações Tipo I e

Tipo II, que oxidam cromóforos e fragmentam o corante.⁹ Esses achados confirmam o potencial da DMC como fotossensibilizador eficiente em solução.

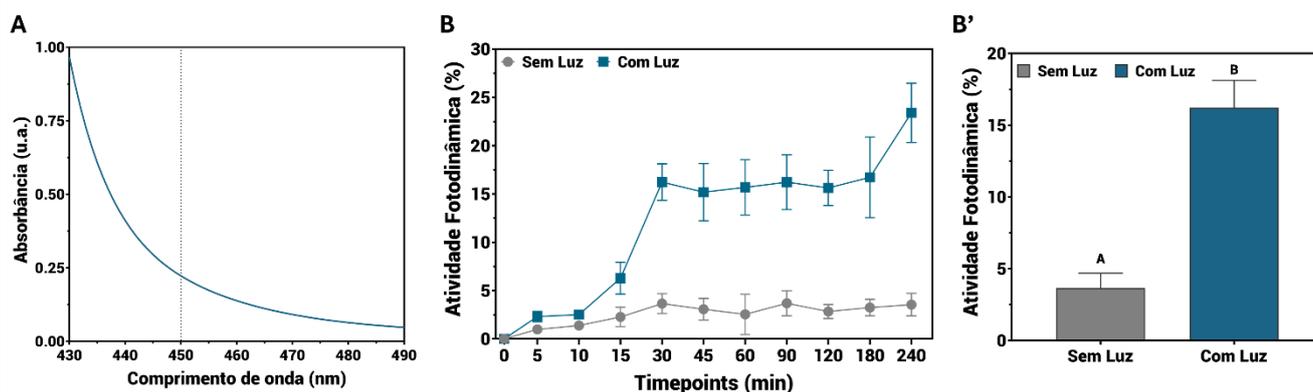


Figura 3. (a) Espectro de absorção UV-Vis da solução de demeclociclina (500 µg/mL). (b) Atividade fotodinâmica da DMC sob irradiação azul ($\lambda \approx 450$ nm). (b') Análise quantitativa da atividade fotodinâmica após 30 min de irradiação. Dados expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 3$). Teste *t* de Student, $p = 0,0062$.

3.3. Ensaios Microbiológicos

Nos ensaios microbiológicos, o controle negativo (sem DMC) manteve alta viabilidade microbiana ($7,47 \pm 0,59 \log_{10}$ UFC/mL), sem redução significativa sob irradiação azul isolada ($7,16 \pm 0,38$; $p = 0,7445$), o que evidencia a resistência do biofilme polimicrobiano. O tratamento com DMC em escuro promoveu queda superior a 1 log, reduzindo a viabilidade para $5,83 \pm 0,55 \log_{10}$ UFC/mL ($p \leq 0,0001$). Esse efeito intrínseco da DMC decorre principalmente de seu efeito bacteriostático e eventualmente ruptura da bicamada lipídica e interferência na síntese proteica, comprometendo a integridade e o metabolismo bacteriano. Contudo, assim como ocorre com muitos antibióticos, a DMC isolada enfrenta barreiras de penetração na matriz extracelular do biofilme, rica em polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, o que limita sua ação nos estratos mais profundos.¹² Quando combinada à irradiação azul ($\lambda \leq 450$ nm, 30 min), observou-se redução adicional para $4,26 \pm 0,54 \log_{10}$ UFC/mL ($p \leq 0,0002$), confirmando o efeito fotodinâmico da DMC, que passa a gerar espécies reativas de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete). Essas ERO intensificam a peroxidação lipídica, a oxidação de resíduos aminoacídicos e as rupturas de fita de DNA, resultando em lise celular.^{4,7,8} As micrografias de MEV corroboram esses achados, mostrando leve redução da matriz, possivelmente pelo destacamento de células mortas após TFDa. Esses resultados indicam que, embora a DMC apresente atividade antimicrobiana intrínseca significativa, seu potencial microbicida aumenta com a fotoativação.

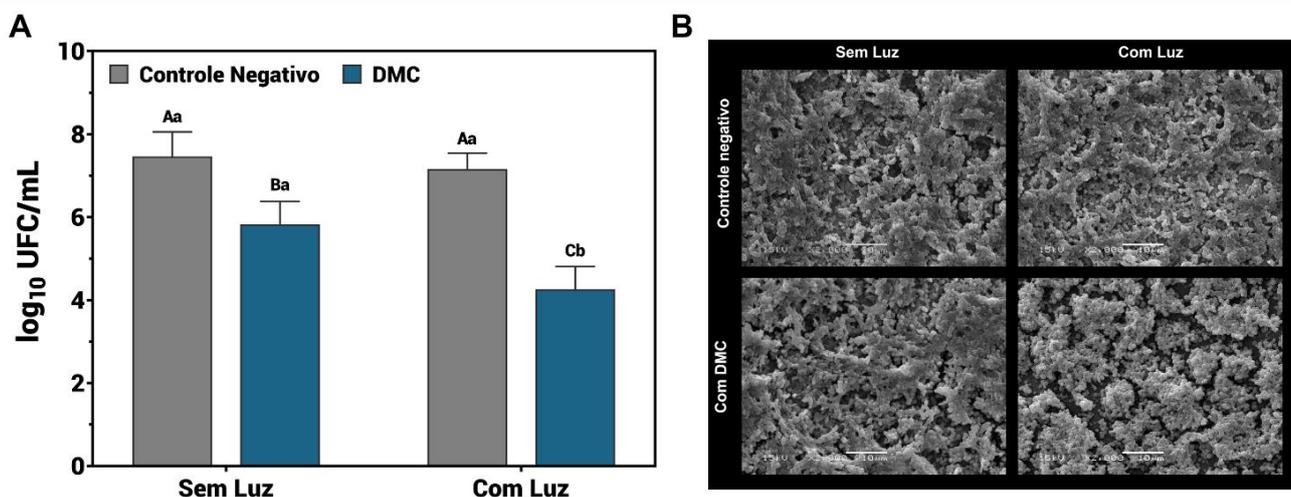


Figura 4. (a) Quantificação da viabilidade bacteriana em biofilmes tratados com DMC (500 µg/mL) e/ou irradiação azul, a em \log_{10} UFC/mL como média \pm desvio-padrão ($n = 6$). ANOVA de dois fatores seguida de pós-teste de Tukey; $p < 0,05$. (b) Fotomicrografias de MEV ($\times 2\ 000$) dos biofilmes dos diferentes grupos.

4. Conclusão

Em síntese, a demeclociclina distingue-se de outros fotossensibilizadores ao combinar, em um único fármaco já regulamentado, ação bacteriostática intrínseca e geração eficiente de ERO sob luz azul, superando a limitação de agentes que só atuam durante a irradiação. Ao atuar simultaneamente como antibiótico e fotossensibilizador, a DMC representa uma estratégia promissora para o controle de biofilmes peri-implantares, potencialmente contribuindo para o tratamento de infecções peri-implantares.

5. Bibliografia

1. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun 1;45:S246–66.
2. Ramanauskaite A, Fretwurst T, Schwarz F. Efficacy of alternative or adjunctive measures to conventional non-surgical and surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent*. 2021 Dec;7(1):112.
3. Chambrone L, Wang HL, Romanos GE. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review. *J Periodontol*. 2018 Jul 1;89(7):783–803.
4. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 571–89.
5. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(4):279–93.
6. Hamblin MR, Abrahamse H. Tetracyclines: Light-Activated Antibiotics? *Future Med Chem*. 2019 Sep 23;11(18):2427–45.
7. He Y, Huang YY, Xi L, Gelfand JA, Hamblin MR. Tetracyclines function as dual-action light-activated antibiotics. *PLoS One*. 2018 May 9;13(5):e0196485.
8. Xuan W, He Y, Huang L, Huang YY, Bhayana B, Xi L, et al. Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Tetracyclines in Vitro and in Vivo: Photochemical Mechanisms and Potentiation by Potassium Iodide. *Sci Rep*. 2018 Nov 20;8(1):17130.
9. Nagay BE, Dini C, Cordeiro JM, Ricomini-Filho AP, De Avila ED, Rangel EC, et al. Visible-Light-Induced Photocatalytic and Antibacterial Activity of TiO₂ Codoped with Nitrogen and Bismuth: New Perspectives to Control Implant-Biofilm-Related Diseases. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 May 22;11(20):18186–202.
10. Dini C, Costa RC, Bertolini M, Shibli JA, Feres M, Klein MI, et al. In-vitro polymicrobial oral biofilm model represents clinical microbial profile and disease progression during implant-related infections. *J Appl Microbiol*. 2023 Nov 1;134(11).
11. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001 Jun;65(2):232–60.
12. Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. Vol. 21, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2023. p. 70–86.