

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELA FRANCO DIAS BRUZADELLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA TOXICIDADE DO
PHTALOX® EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Galleria mellonella***

Alfenas/MG

2023

RAFAELA FRANCO DIAS BRUZADELLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA TOXICIDADE DO
PHTALOX[®] EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Alfenas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Bruzadelli, Rafaela Franco Dias .

Avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade do Phtalox® em modelos in vitro e in vivo de Galleria mellonella / Rafaela Franco Dias Bruzadelli. - Alfenas, MG, 2023.

65 f. : il. -

Orientador(a): Masaharu Ikegaki.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Checkerboard. 2. Biofilme multiespécies. 3. Doença periodontal. 4. Ferro-ftalocianina. I. Ikegaki, Masaharu , orient. II. Título.

RAFAELA FRANCO DIAS BRUZADELLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA TOXICIDADE DO PHTALOX® EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Galleria mellonella***

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 28 de julho de 2023.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata -

Instituição: East Carolina University - ECU - Estados Unidos

Profa. Dra. Patricia Paiva Corsetti de Almeida

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Masaharu Ikegaki, Presidente**, em 14/08/2023, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1046436** e o código CRC **9A3D13F8**.

Dedico este trabalho ao meu avô,
Oraldo Gabriel Dias.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À agência de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki, pela orientação científica durante a realização de todo o trabalho e pelos valiosos conselhos e ensinamentos que levarei por toda vida. Serei eternamente grata pela oportunidade, obrigada por ter acreditado no meu potencial.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade, e principalmente aos professores por todo aprendizado.

À Universidade de Guarulhos (UNG) onde parte essencial da pesquisa foi realizada, principalmente ao Prof. Dr. Bruno Bueno Silva por todos os ensinamentos e ao doutorando Lucas Daylor pela acolhida.

À Profa. Dra. Ingridy Simone Ribeiro que abriu as portas do mundo científico durante a graduação e sempre acreditou em mim.

Aos técnicos Dr. Gustavo Silveira (Laboratório de Bioprocessos UNIFAL/MG) e Dra. Patrícia Lunardelli (Laboratório de Microbiologia de Alimentos UNIFAL/MG) pela paciência e todos os ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório, Lucas Tironi e Namuhell Oliveira por todos ensinamentos.

Ao Leonardo Araújo, bolsista de Iniciação Científica vinculado a minha pesquisa, que foi essencial para a realização deste trabalho.

À minha família Aline, Armando, Simone, Arleide e José por todo o amor incondicional e suporte que sempre me deram. Em especial, a Tia Maria por ser meu maior exemplo e a pessoa que mais acredita em mim.

Aos meus amigos, Elaine Lima, Nayara Clarete, Monique Benedetti, Luiz Ferreira, Natália Melo e Thiago Belo, que são minha família em Alfenas.

E por último, ao meu noivo Gabriel Tavares Leite, por toda paciência e apoio durante todos esses anos. Obrigada por ter acreditado tanto em mim e nunca ter deixado eu desistir.

RESUMO

A doença periodontal é uma condição em que ocorre a deterioração progressiva dos tecidos moles e duros que compõem o complexo periodontal. Essa deterioração é resultado de uma interação complexa entre comunidades microbianas disbióticas e respostas imunológicas exacerbadas nos tecidos gengivais e periodontais. No contexto dessa doença, o biofilme periodontopatogênico é uma comunidade de microrganismos composta por diversos gêneros e espécies bacterianas, como a *Porphyromonas gingivalis* e a *Tannerella forsythia*. O tratamento para a doença periodontal muitas vezes envolve o uso de antibióticos, e, portanto, há uma necessidade de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos antibióticos capazes de inibir ou eliminar o biofilme presente. Nesse contexto, o Phtalox® (PHT) surge como um potencial antimicrobiano. Trata-se de uma ferro-ftalocianina modificada com grupos carboxila em suas extremidades e ferro no centro, que exhibe propriedades oxidantes, promovendo a geração contínua de oxigênio reativo na presença de oxigênio molecular. Neste estudo, foi realizado o teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando bactérias sésseis. Adicionalmente, foi cultivado e tratado um biofilme subgengival de sete dias composto por 33 espécies bacterianas. A atividade metabólica e a composição microbiana do biofilme foram avaliadas por meio da técnica de hibridização DNA-DNA, conhecida como técnica *Checkerboard*. Para o teste de toxicidade e de atividade antimicrobiana *in vivo* foi utilizado o modelo de *Galleria mellonella*, pois é um método reconhecido pela Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (RENAMA), onde as larvas possuem resposta imune celular mediada por células fagocíticas que podem ser comparadas aos neutrófilos dos mamíferos. Os resultados obtidos no teste de CIM indicaram que o PHT não apresentou inibição frente aos microrganismos testados e nas condições do método. No entanto, o PHT na concentração de 10.000 µM demonstrou eficácia estatisticamente semelhante à Clorexidina 2.374 µM (CLX) na redução do biofilme multiespécie subgengival *in vitro*, inibindo o crescimento de patógenos-chave da doença. Os testes de toxicidade *in vivo* utilizando o modelo de *G. mellonella* demonstraram que o produto não é tóxico, mesmo em altas dosagens. Além disso, o PHT se mostrou tão eficaz quanto a CLX para a sobrevivência das larvas infectadas com *Staphylococcus aureus*. Esses resultados destacam o potencial do Phtalox® como uma alternativa promissora no combate à doença periodontal.

Palavras-chave: *Checkerboard*; biofilme multiespécies; doença periodontal; ferro-ftalocianina.

ABSTRACT

Periodontal disease is a condition characterized by progressive deterioration of the soft and hard tissues that comprise the periodontal complex. This deterioration is the result of a complex interaction between imbalanced microbial communities and exacerbated immune responses in the gingival and periodontal tissues. In the context of this disease, the periodontopathogenic biofilm is a community of microorganisms composed of various bacterial species, such as *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. Supportive treatment for periodontal disease often involves the use of antibiotics, thus necessitating research focused on the development of new antibiotics capable of inhibiting or eliminating the biofilm. In this context, Phtalox[®] (PHT) emerges as a potential antimicrobial agent. It is a modified iron phthalocyanine with carboxyl groups at its ends and iron at the center, exhibiting oxidizing properties that promote continuous generation of reactive oxygen in the presence of molecular oxygen. In this study, the minimum inhibitory concentration (MIC) determination test was performed using sessile bacteria. Additionally, a seven-day subgingival biofilm composed of 33 bacterial species was cultivated and treated. The metabolic activity and microbial composition of the biofilm were evaluated using the DNA-DNA hybridization technique, known as the *Checkerboard* technique. The *Galleria mellonella* model was used for *in vivo* toxicity and antimicrobial activity testing, as it is a method recognized by the National Network of Alternative Methods to Animal Use (RENAMA), where the larvae possess a cellular immune response mediated by phagocytic cells that can be compared to mammalian neutrophils. The results of the MIC test indicated that PHT did not perform well against the tested microorganisms under the conditions of the method. However, PHT at a concentration of 10,000 μM demonstrated statistically similar efficacy to Chlorhexidine 2.374 μM (CLX) in reducing the *in vitro* subgingival multispecies biofilm, inhibiting the growth of key disease pathogens. *In vivo* toxicity tests using the *G. mellonella* model demonstrated that the product is not toxic, even at high dosages. Furthermore, PHT proved to be as effective as CLX in promoting the survival of larvae infected with *Staphylococcus aureus*. These results highlight the potential of Phtalox[®] as a promising alternative in the fight against periodontal disease.

Keywords: *Checkerboard*, multispecies biofilm, periodontal disease, iron phthalocyanine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do agrupamento por cor do biofilme periodontopatogênico.....	15
Figura 2 - Estrutura geral de uma ftalocianina.....	17
Figura 3 - Estrutura da Ftalocianina de ferro - Phtalox®.....	18
Figura 4 - Local da inoculação nas larvas de <i>Galleria mellonella</i>	20
Figura 5 - Diferentes estágios de desenvolvimento da <i>Galleria mellonella</i>	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	DOENÇA PERIODONTAL	13
2.1.1	<i>Microrganismos periodontopatogênicos</i>	14
2.2	FTALOCIANINAS	16
2.2.1	<i>Ftalocianina de ferro - Phtalox® e atividades biológicas</i>	17
2.3	<i>GALLERIA MELLONELLA</i>	19
3	RESULTADOS	22
3.1	ARTIGO I – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA TOXICIDADE DO PHTALOX® EM MODELOS DE ESTUDO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	23
3.2	ARTIGO II – FTALOCIANINA INIBE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PRESENTES NA DOENÇA PERIODONTAL: ESTUDO <i>IN VITRO</i>	40
4	CONCLUSÕES	58
5	PRODUTOS E COLABORAÇÕES	59
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Biofilmes são uma comunidade de microrganismos, crescendo de forma coordenada, protegidos dentro de uma matriz extracelular de fatores ambientais externos, do sistema imunológico do hospedeiro e de antimicrobianos (ZUPANČIČ *et al.*, 2018). Em sistemas biológicos, as bactérias são frequentemente observadas em biofilmes, ao invés das formas planctônicas. Além disso, estes biofilmes podem ser formados com espécies únicas, multiespécies ou polimicrobianos (ANJU *et al.*, 2022).

Em um indivíduo imunocompetente, as bactérias da microbiota fisiológica normal existem em equilíbrio natural com o hospedeiro. Diferentes fatores, como tabagismo, diabetes, predisposição genética ou má higiene dental, podem fazer com que a comunidade bacteriana se torne disbiótica, permitindo que bactérias potencialmente patogênicas aumentem em número e causem infecções persistentes, como a doença periodontal (BLOCH *et al.*, 2019).

A doença periodontal é caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos moles e duros do complexo periodontal, mediada por uma interação entre comunidades microbianas disbióticas e respostas imunes exacerbadas nos tecidos gengivais e periodontais (SEDGHI; BACINO; KAPILA, 2021). Como forma de tratamento, é recomendado a remoção física do biofilme por raspagem em conjunto com o uso de agentes antibióticos como tratamento de suporte, sendo a clorexidina o mais recomendado atualmente (HAQUE *et al.*, 2022).

Um modelo abrangente de interações multiespécies na periodontite foi definido por Socransky *et al.* (1998) que, usando sondas de DNA genômico e hibridização DNA-DNA (*Checkerboard*), identificou as espécies que aparecem de forma mais abundante na doença e propôs a formação de agrupamentos em complexos (SEDGHI; BACINO; KAPILA, 2021). Além disso, identificou *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* como espécies que aumentam a severidade da doença periodontal, agrupando-as no “complexo vermelho” (SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRAANSKY; HAFFAJEE, 2005). Ao longo dos anos, outros gêneros foram sendo associados à periodontite, como *Filifactor*, *Synergistetes* e *Peptostreptococcaceae*, e *Actinomyces actinomycetemcomitans* foi associada à periodontite agressiva (SEDGHI;

BACINO; KAPILA, 2021).

A clorexidina, apesar de ser considerada padrão ouro para o tratamento de suporte da doença periodontal atualmente, possui efeitos adversos devido ao seu uso prolongado (HAQUE *et al.*, 2022), como pigmentação dos tecidos moles e dentes, e alteração do paladar (STEFANO *et al.*, 2022). Além disso, a resistência microbiana em bactérias causadoras da doença periodontal é uma preocupação crescente em todo o mundo (RAMS; DEGENER; WINKELHOFF, 2014). Portanto, faz-se necessário a busca por novos compostos antimicrobianos capazes de atuar no biofilme periodontal.

O Phtalox[®] é uma ferro-ftalocianina modificada que apresenta carboxilas em suas extremidades e ferro em seu centro. Este composto pode promover autoativação e produção contínua de oxigênio reativo na presença de oxigênio molecular (POLETI *et al.*, 2022). Há poucos estudos quanto à sua atividade antimicrobiana, mas os existentes indicam o seu potencial contra *Streptococcus mutans* (TEODORO *et al.*, 2020).

O desenvolvimento dos estudos envolvendo o Phtalox[®] tem como parceria a empresa TRIALS - Saúde Bucal & Tecnologias por meio do edital da CNPq nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação MAI/DAI, onde esta molécula derivada de uma ftalocianina possui patente requerida e está sob sigilo.

Diante disso, a pesquisa objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade do Phtalox[®] (Tetracarboxi-ferro-ftalocianina) em modelos *in vitro* e *in vivo* de *Galleria mellonella*. Com esses estudos, espera-se contribuir para o desenvolvimento de um novo composto antimicrobiano para auxiliar no tratamento de suporte da doença periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal se refere a distúrbios inflamatórios comuns conhecidos como gengivite e periodontite, que são causados por uma microbiota patogênica no biofilme subgengival (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Esses microrganismos desencadeiam respostas imunes inatas, inflamatórias e adaptativas (SILVA *et al.*, 2015). Por isso, a doença é caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos do aparelho de suporte dentário (FIGUEIREDO *et al.*, 2022).

Essa patologia afeta cerca de 20 a 50% das pessoas em todo o mundo, e estima-se que a sua prevalência aumente no futuro, sobretudo devido ao envelhecimento da população em geral (STEFANO *et al.*, 2022). É um grande problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, afetando negativamente a função mastigatória e estética, resultando desigualdade social e prejudicando a qualidade de vida (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

O tratamento consiste em controlar o número de microrganismos periodontopatogênicos para reduzir ou eliminar a inflamação tecidual (FIGUEIREDO *et al.*, 2020). O padrão-ouro atualmente é a raspagem e alisamento radicular, que consiste em um procedimento não-cirúrgico no qual o periodontista remove mecanicamente a placa bacteriana abaixo da margem gengival, desorganizando o biofilme ali presente (FIGUEIREDO *et al.*, 2022).

O uso de enxaguantes bucais é uma das formas de controle químico dos biofilmes, onde o mais recomendado atualmente é a clorexidina, por exercer um efeito bactericida ou bacteriostático no biofilme periodontal (FIGUEIREDO *et al.*, 2022). Embora a clorexidina seja um dos agentes antimicrobianos mais eficazes, seu uso não isenta o indivíduo de efeitos colaterais. Os principais efeitos adversos relatados são inchaço da glândula parótida, pigmentação dos tecidos moles orais e dentes, reações de hipersensibilidade tipo 1, alteração do paladar, sensação de queimação, ulceração ou erosões da mucosa oral, sensação anestésica transitória e parestesia (STEFANO *et al.*, 2022; PALKA; NOWAKOWSKA-TOPOROWSKA; DALEWSKI, 2022).

Há um intenso esforço nas pesquisas atuais para encontrar novos antimicrobianos com capacidade de inibir ou eliminar o biofilme multiespécies subgengival e que não tenha os mesmos efeitos colaterais provocados pela clorexidina (FIGUEIREDO *et al.*, 2022).

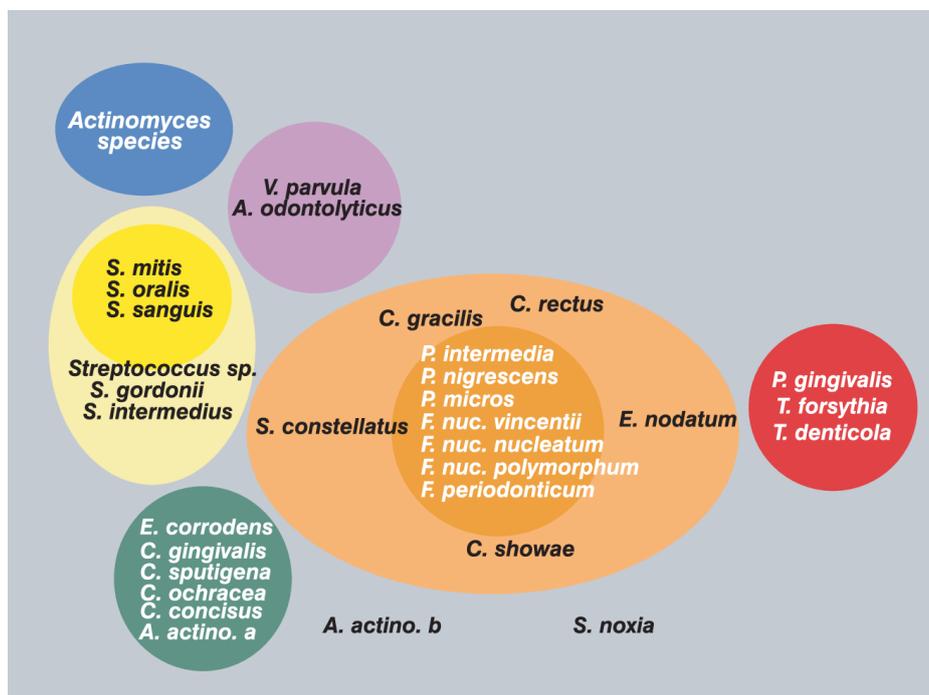
Além disso, observa-se um crescente aumento na prevalência de bactérias orais desenvolvendo resistência aos antibióticos (SEDGHI; BACINO; KAPILA, 2021). De acordo com a pesquisa de Rams, Degener e Winkelhoff (2014), realizada com 400 pacientes adultos diagnosticados com periodontite crônica, constatou-se que 74,2% deles apresentavam bactérias orais resistentes a pelo menos um dos antibióticos analisados. Esses resultados ressaltam a necessidade de investigações voltadas para o desenvolvimento de novos antibióticos, que possam ser empregados no tratamento dessa doença.

2.1.1 Microrganismos periodontopatogênicos

O microbioma oral é um dos ambientes mais heterogêneos do corpo humano, pois contém arqueias, bactérias, fungos, vírus e protozoários, organizados em complexos biofilmes multiestruturais, que estão em constante interação entre si, com o sistema imunológico do hospedeiro e com fatores externos (PALKA; NOWAKOWSKA-TOPOROWSKA; DALEWSKI, 2022). Os microrganismos colonizam as superfícies duras dos dentes e os tecidos moles da mucosa oral (STEFANO *et al.*, 2022).

O biofilme periodontopatogênico é uma comunidade complexa de microrganismos composta por diversas espécies bacterianas, cuja classificação por grupos foi proposta por Socransky *et al.* (1998), com base na sua virulência e transição saúde-doença, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Representação do agrupamento por cor do biofilme periodontopatogênico.



Fonte: SOCRANSKY; HAFFAJEE (2005, p. 15).

Legenda: Complexos saudáveis - Azul (Espécies de *Actinomyces*), Amarelo (Espécies de *Streptococcus*); Roxo (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*) e Verde (*Capnocytophaga*, *Eikenella* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Complexo transição saúde-doença - Laranja (Espécies como *C. gracilis*, *C. rectus*, *S. constellatus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *R. intermedia* e *F. nucleatum*). Complexo vermelho - Associado à inflamação e à progressão da doença periodontal (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*).

Espécies de *Actinomyces* são comumente encontradas em indivíduos isolados saudáveis (SEDGHI; BACINO; KAPILA, 2021). O complexo amarelo inclui biofilmes saudáveis, composto por várias espécies do gênero *Streptococcus spp.* (SOCRANSKY *et al.*, 1998). *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus salivarius* são colonizadores primários da cavidade oral saudável (SEDGHI *et al.*, 2021).

O complexo roxo é composto principalmente por *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*, que possibilitam posterior colonização por integrantes do complexo verde, como *Capnocytophaga sp.*, *Eikenella sp.* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Estes primeiros biofilmes são considerados saudáveis e não causam doenças, a menos que ocorra uma mudança na composição microbiana (MIRANDA *et al.*,

2019).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é uma bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa, comumente encontrada em periodontite agressiva localizada (HERBERT; NOVINCE; KIRKWOOD, 2016). É considerada um dos patógenos chave para a doença em jovens (MARTINEZ *et al.*, 2022).

Caso não sejam interrompidos, os biofilmes saudáveis podem criar condições que favorecem a colonização de espécies do complexo laranja, que está relacionado à transição saúde-doença, pois podem favorecer a colonização por espécies do complexo vermelho (MIRANDA *et al.*, 2019).

As bactérias do complexo vermelho são *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, sendo consideradas os principais patógenos da doença periodontal, pois geralmente aparecem juntas e estão relacionadas ao aumento da gravidade da doença (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Podem causar uma resposta inflamatória exacerbada que leva à destruição tecidual (FIGUEIREDO *et al.*, 2020). São comumente detectadas na periodontite crônica, e a eliminação dessas bactérias pode interromper a progressão da doença (TSUCHIDA; NAKAYAMA, 2022).

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria Gram-negativa e anaeróbia estrita que, mesmo em baixa concentração no biofilme, é capaz de induzir a periodontite crônica, sendo considerada um patógeno chave para a doença (XU *et al.*, 2020).

2.2 FTALOCIANINAS

São compostos aromáticos, em geral de cor azul esverdeada, usualmente planares, ligeiramente solúveis e que possuem quatro unidades de anéis de isoindol ligados entre si através de átomos de nitrogênio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; MORI; SHIBATA, 2017). Exibem propriedades fotofísicas, fotoquímicas, semicondutoras e fotocondutoras particularmente interessantes (ARAÚJO *et al.*, 2020), como por exemplo, excelente estabilidade química e térmica e alta resposta à exposição à luz (NEAMTU *et al.*, 2020).

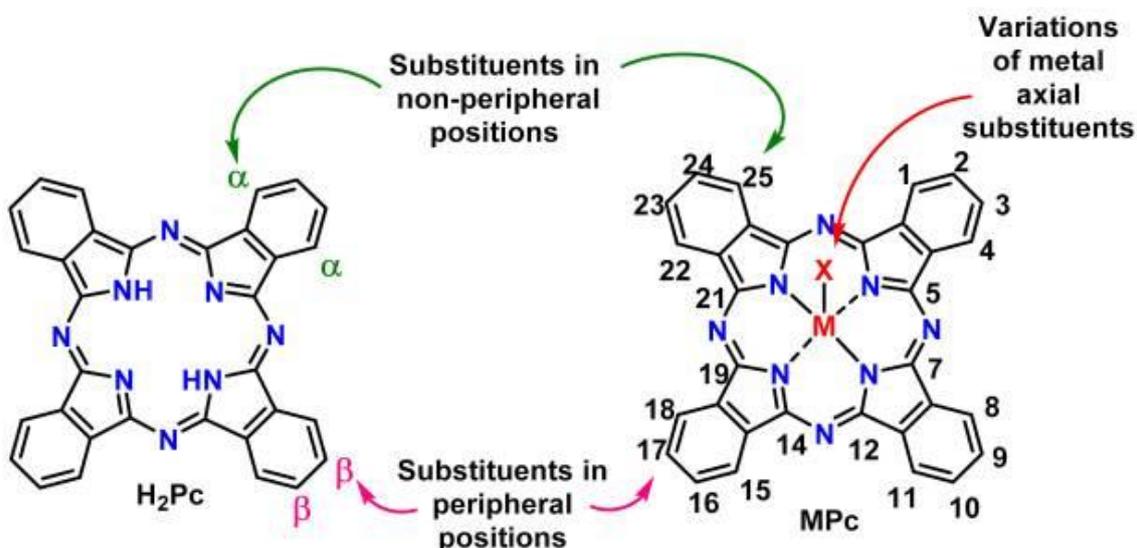
As ftalocianinas começaram a ser sintetizadas no início do século XX e ganharam destaque na indústria têxtil e de corantes por causa da sua

estabilidade térmica e baixa solubilidade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Além disso, podem ser utilizadas em dispositivos eletrônicos na área médica e no método fotodinâmico de tratamento de câncer (MORI; SHIBATA, 2017).

As ftalocianinas são consideradas corantes, pois absorvem fortemente na parte vermelha e infravermelha próxima do espectro visível, proporcionando-lhes sua característica cor azul ou esverdeada (SEKKAT *et al.*, 2012).

Devido à grande estrutura macrocíclica aromática das ftalocianinas, uma variedade de metais, como Ferro, Zinco, Cobre, Manganês, Cobalto, Níquel, Silício e Rutênio, podem ser ligados dentro do ciclo, substituindo os dois átomos de hidrogênio (NEAMTU *et al.*, 2020). Esta substituição pode ser incorporada ao núcleo da ftalocianina nas posições designadas como α (não periférico) e como β (periférico) (SCHMIDT; CALVETE, 2021), conforme Figura 2.

Figura 2 - Estrutura geral de uma ftalocianina.



Fonte: SCHMIDT; CALVETE (2021, p. 2)

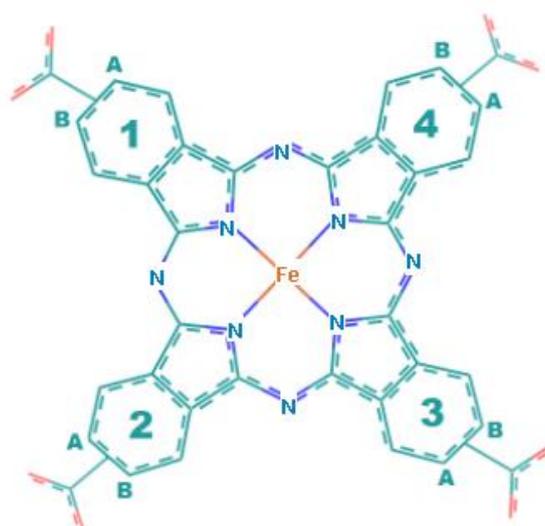
Legenda: Estrutura geral da ftalocianina sem metal (esquerda) e com metal (direita), com representação esquemática de possíveis sítios de modulação estrutural e numeração de anéis.

2.2.1 Ftalocianina de ferro - Phtalox[®] e atividades biológicas

O produto Phtalox[®] é composto por uma molécula ferro-ftalocianina modificada que apresenta carboxilas em suas extremidades e ferro em seu

centro, conforme mostrado na Figura 3. É um composto com propriedades oxidantes, com princípio de promover autoativação e produção contínua de oxigênio reativo na presença de oxigênio molecular (POLETI *et al.*, 2022). Por conter ferro em seu centro, aumenta a atividade biológica se auto-ativando pela presença de oxigênio, dispensando a fotoativação (SANTOS, C. *et al.*, 2021).

Figura 3 - Estrutura da Ftalocianina de ferro - Phtalox[®]



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: Posições das carboxilas nas extremidades do composto indicadas pelos números 1, 2, 3 e 4.

Segundo Teodoro *et al.* (2020), este derivado de ftalocianina é um composto que apresenta citotoxicidade inferior em comparação ao flúor, sendo classificado como inerte devido aos efeitos toxicológicos. Além disso, apresentou resultados positivos na inibição de *Streptococcus mutans* (TEODORO *et al.*, 2020).

O gel dental experimental de Phtalox[®] se mostrou eficiente no clareamento do esmalte dentário, visto que após o tratamento foram observados dentes mais brancos (VILHENA *et al.*, 2022).

Além disso, este derivado de ftalocianina também foi testado contra o vírus SARS-CoV-2. O enxaguante bucal feito à base de um derivado de ftalocianina conseguiu reduzir alguns sintomas da COVID-19, como tosse, fadiga, falta de ar e dor de garganta (ORCINA *et al.*, 2021; POLETI *et al.*, 2022). Em

estudo semelhante, Santos P. S. S *et al.* (2021) demonstraram que a tetracarboxi-ferro-ftalocianina é altamente eficaz na redução da carga viral de SARS-CoV-2 *in vitro*, possui baixa citotoxicidade e diminui o tempo de internação hospitalar por COVID-19.

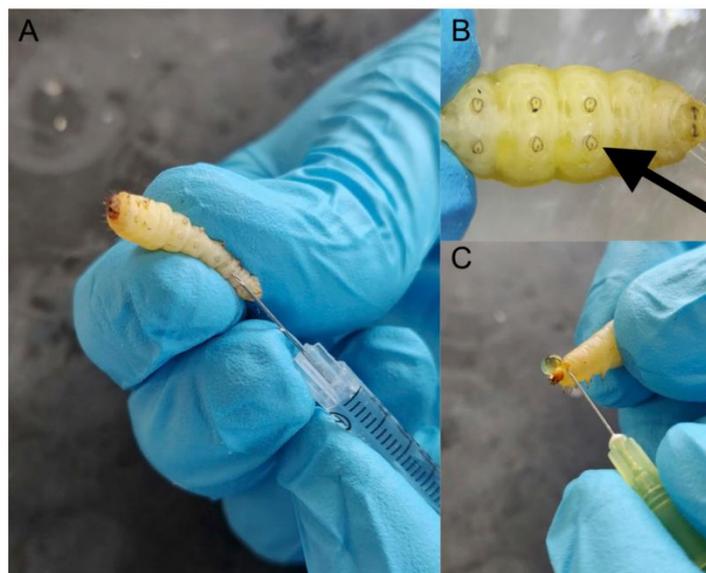
São poucos os estudos acerca da tetracarboxi-ferro-ftalocianina, principalmente sobre a sua atividade contra microrganismos patogênicos, necessitando assim de mais pesquisas.

2.3 GALLERIA MELLONELLA

Os modelos murinos têm sido considerados o padrão-ouro para o estudo de infecções microbianas (PEREIRA *et al.*, 2018) e de toxicidade de novos fármacos (MÉNARD *et al.*, 2021). Mas esses modelos estão no centro das preocupações sociais e éticas da comunidade científica sobre o uso de animais para pesquisa, além de que manter estes animais é caro e requer a manutenção de um número grande de animais para obter dados estatisticamente significativos (PEREIRA *et al.*, 2018; JORJÃO *et al.*, 2018).

Em comparação com modelos murinos, as larvas de *G. mellonella* são mais baratas de criar em laboratório, pois não requerem equipamentos especiais e possuem curto ciclo de vida, o que as tornam ideais para estudos com grande número de amostras (TSAI; LOH; PROFT, 2016; JORJÃO *et al.*, 2018). Além disso, seu pequeno tamanho simplifica a infecção, que envolve a inoculação através da *proleg* posterior utilizando uma seringa com a quantidade definida de patógeno (PEREIRA *et al.*, 2018), conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Local da inoculação nas larvas de *Galleria mellonella*.



Fonte: KAVANAGH; SHEEHAN (2018, p. 3)

Legenda: (A) As larvas são inoculadas com um volume específico (por exemplo, 10 μL) na última proleg usando uma seringa, (B) imagem ampliada da última proleg, (C) demonstração do método para obter hemolinfa de larvas.

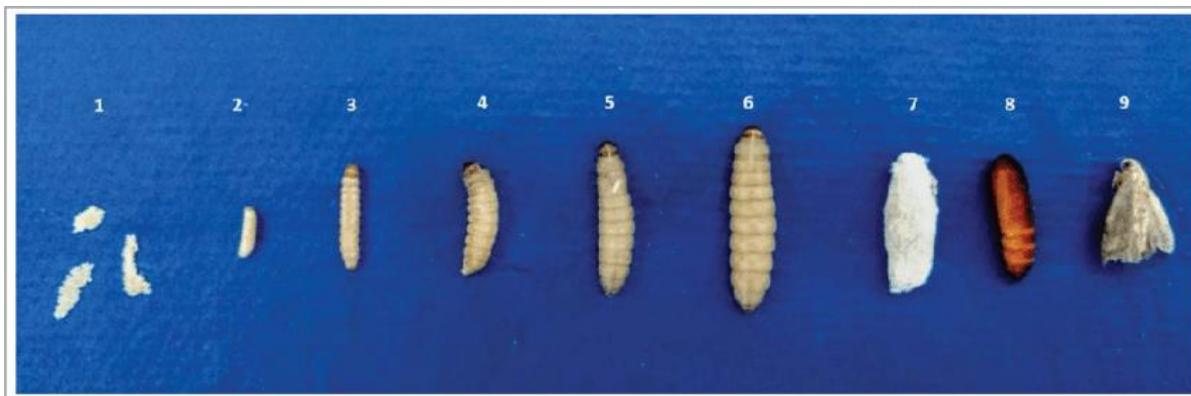
A rede nacional de métodos alternativos ao uso de animais (RENAMA) reconhece o uso das larvas de *G. mellonella* como modelo alternativo de invertebrados (BENADUCCI *et al.*, 2016). A principal vantagem desta larva sobre outros modelos alternativos deve-se a sua capacidade de sobreviver a 37 °C, portanto, permitem testes com microrganismos dependentes de temperaturas mais elevadas (LOH *et al.*, 2013; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

De nome popular Mariposa-da-cera, é um inseto da ordem dos Lepidópteros e família *Pyralidae* (WODJA *et al.*, 2020). Este inseto está presente em todos os continentes (exceto a Antártica) e sua ocorrência coincide com a economia apícola de cada país, pois é considerada uma praga encontrada em colmeias de diversas abelhas (WODJA *et al.*, 2020). Entretanto, apesar de ser prejudicial para as abelhas, elas são inofensivas para os seres humanos, não representando uma ameaça direta à saúde humana, sendo seguras para trabalhar em um ambiente de laboratório (SMITH; CASADEVALL, 2021).

Trata-se de um inseto holometábolo, seguindo um ciclo de vida que compreende quatro estágios distintos de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e, por fim, o estágio adulto, conforme mostrado na Figura 5 (JORJÃO *et al.*, 2018; WODJA *et al.*, 2020). Todo o ciclo de vida dura aproximadamente 40 a 45 dias

(JORJÃO *et al.*, 2018; DESAI *et al.*, 2019; WODJA *et al.*, 2020).

Figura 5 - Diferentes estágios de desenvolvimento da *Galleria mellonella*.



Fonte: JORJÃO *et al.* (2018, p. 3).

Legenda: Ovos (1), estágios larvais (2 a 6), pré-pupa (7), pupa (8) e mariposa adulta (9).

Em condições naturais, as larvas se alimentam de favos de mel, que contém uma quantidade significativa de cera de abelha, mel, exúvias de larvas de abelhas e resíduos de pólen (DESAI *et al.*, 2019; WODJA *et al.*, 2020). Em laboratório, esses insetos podem se desenvolver em uma dieta artificial composta por leite em pó, fermento, mel, glicerol e produtos à base de cereais, como farinha de trigo, milho e cevada (JORJÃO *et al.*, 2018; DESAI *et al.*, 2019; WODJA *et al.*, 2020).

Os insetos não possuem um sistema imunológico adaptativo, mas seu sistema inato compartilha muitas semelhanças com o dos mamíferos (MÉNARD *et al.*, 2021). A resposta imune celular é mediada por células fagocíticas, denominadas hemócitos (BOMAN; HULTMARK, 1987; TSAI; LOH; PROFT, 2016), que podem ser comparadas aos neutrófilos dos mamíferos (MÉNARD *et al.*, 2021). Na *G. mellonella* há seis tipos de hemócitos que circulam livremente pela hemolinfa, sendo eles: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, coagulócitos e oenotócitos (BOMAN; HULTMARK, 1987; PEREIRA *et al.*, 2018). Eles estão implicados em diferentes funções fisiológicas, como fagocitose, encapsulamento e melanização (BOMAN; HULTMARK, 1987; MÉNARD *et al.*, 2021).

3 RESULTADOS

De acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, conforme descrito no artigo 62, é permitido, a critério do Orientador e da Discente, que a Dissertação inclua um artigo produzido durante o curso, desde que seja incorporado como um capítulo. Neste formato, a dissertação deverá conter introdução e conclusão, além dos outros elementos pré-textuais e pós-textuais, os quais deverão ser escritos em português. No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, sob a forma de dois artigos, redigidos para publicação em periódicos na área.

O artigo I, intitulado “Avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade do Phtalox[®] em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*” representa uma etapa inicial de testes realizados com a amostra Ftalocianina de Ferro (Phtalox[®]) para avaliar sua atividade antimicrobiana em relação a bactérias planctônicas. Para isso, foram empregados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM). Além disso, o artigo também descreve os resultados obtidos por meio de ensaios *in vivo*, utilizando larvas de *G. mellonella*, com o intuito de avaliar tanto a toxicidade sistêmica quanto a atividade antimicrobiana do Phtalox[®].

O artigo II, intitulado "Ftalocianina inibe o crescimento de bactérias presentes na doença periodontal: estudo *in vitro*", concentrou-se na investigação das propriedades anti-biofilme da amostra Ftalocianina de Ferro (Phtalox[®]). Para tal, foi utilizado um modelo de biofilme multiespécies subgingival composto por 33 espécies bacterianas, patógenos encontrados na doença periodontal. O objetivo principal do estudo foi avaliar a capacidade da Ftalocianina de Ferro em inibir o crescimento dessas bactérias, fornecendo informações valiosas sobre seu potencial no tratamento de suporte da doença periodontal.

3.1 ARTIGO I – Avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade do Phtalox® em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA TOXICIDADE DO PHTALOX® EM MODELOS DE ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Rafaela Franco Dias Bruzadelli¹; Namuhell Oliveira da Silva¹; Leonardo Pereira Araújo¹; Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho²; Pedro Luiz Rosalen¹; Fabiano Vieira Vilhena³; Marcelo Franchin⁴; Leandro Araújo Fernandes⁴, Masaharu Ikegaki^{1,2}.

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, MG, Brasil.

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

³TRIALS – Saúde Bucal & Tecnologias

⁴Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

Resumo

A resistência antimicrobiana é uma preocupação crescente que compromete a eficácia dos tratamentos existentes. Nesse contexto, o Phtalox® (PHT), uma ferro-ftalocianina modificada com propriedades oxidantes e atividade antimicrobiana promissora, tem despertado interesse como uma nova opção terapêutica. Nesta pesquisa, buscamos avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro*, utilizando o teste da concentração inibitória e microbicida mínima (CIM e CMM), bem como sua toxicidade e atividade antimicrobiana *in vivo* utilizando o modelo de *Galleria mellonella*. Os resultados indicaram que o PHT não apresentou inibição dos microrganismos testados nas condições do método, porém, no teste *in vivo* utilizando *Staphylococcus aureus*, o PHT se mostrou tão eficaz quando o controle positivo para a sobrevivência das larvas infectadas com este patógeno. Além disso, o PHT não demonstrou toxicidade mesmo em altas dosagens no teste *in vivo*.

Palavras-chaves: ferro-ftalocianina modificada; *Galleria mellonella*;

Staphylococcus aureus.

1 INTRODUÇÃO

A resistência dos microrganismos aos antibióticos é um problema global de saúde pública que tem se agravado ao longo das últimas décadas. A capacidade dos microrganismos de desenvolver mecanismos de resistência aos antibacterianos tem comprometido a eficácia dessas drogas, tornando os tratamentos mais desafiadores e, em alguns casos, ineficazes (VENTOLA, 2015). Diante deste cenário, é de extrema importância investir em pesquisas e no desenvolvimento de novos antibióticos.

Um exemplo promissor nesse contexto é o Phtalox[®] (PHT), um produto composto por uma molécula de ferro-ftalocianina modificada, contendo carboxilas em suas extremidades e ferro em seu centro. As ftalocianinas possuem uma estrutura macrocíclica aromática que permite a ligação de diversos metais dentro do seu ciclo, substituindo os dois átomos de hidrogênio (NEAMTU *et al.*, 2020).

A presença do ferro no centro da molécula confere ao Phtalox[®] uma atividade biológica aprimorada, pois ele se auto-ativa na presença de oxigênio, dispensando a necessidade de fotoativação (SANTOS, C. *et al.*, 2021). Por isso, essa ferro-ftalocianina é um composto com propriedades oxidantes, com princípio de promover autoativação e produção contínua de oxigênio reativo na presença de oxigênio molecular (POLETI *et al.*, 2022).

Embora haja ainda poucos estudos sobre essa nova molécula, especialmente no que diz respeito à sua atividade contra microrganismos patogênicos, pesquisas preliminares têm demonstrado resultados promissores. Segundo Teodoro *et al.* (2020), este derivado de ftalocianina é um composto que apresenta citotoxicidade inferior em comparação ao flúor, sendo classificado como inerte devido aos efeitos toxicológicos. Além disso, apresentou resultados positivos na inibição de *Streptococcus mutans* (TEODORO *et al.*, 2020). Quando testado contra o vírus SARS-CoV-2, o enxaguante bucal conseguiu reduzir alguns sintomas da COVID-19, como tosse, fadiga, falta de ar e dor de garganta (ORCINA *et al.*, 2021; POLETI *et al.*, 2022).

Para avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade do PHT *in vivo*, foi utilizado as larvas da mariposa *Galleria mellonella*. Essas larvas são amplamente utilizadas devido à sua simplicidade para criação e baixo custo (JORJÃO *et al.*, 2018). Além disso, possuem um sistema imune inato semelhante ao sistema imunológico dos mamíferos (MÉNARD *et al.*, 2021), que inclui a presença de células fagocíticas, denominadas hemócitos (BOMAN; HULTMARK, 1987; TSAI; LOH; PROFT, 2016). O uso desse modelo de larva pode fornecer uma triagem inicial valiosa, ajudando a priorizar compostos promissores para estudos posteriores.

Em conclusão, a resistência dos microrganismos aos antibióticos representa uma ameaça significativa à saúde pública, comprometendo a eficácia dos tratamentos disponíveis. Diante desse desafio, a busca por novos agentes antimicrobianos é essencial, e o PHT surge como uma promissora opção. Portanto, o objetivo desta pesquisa é investigar a atividade antimicrobiana e a toxicidade do PHT *in vitro* utilizando o teste da concentração inibitória e microbicida mínima e *in vivo* utilizando o modelo de *G. mellonella*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO PHTALOX®

O desenvolvimento dos estudos envolvendo o Phtalox® tem como parceria a empresa TRIALS - Saúde Bucal & Tecnologias através do edital da CNPq nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação MAI/DAI, onde essa molécula derivada de uma ftalocianina possui patente requerida e está sob sigilo. O Phtalox® foi fornecido pela empresa TRIALS e a sua dissolução foi realizada com tampão PBS 1x.

2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o protocolo M07-A11 para bactérias (CSLI, 2018) e M27 para leveduras (CLSI, 2017), desenvolvidos pelo *Clinical Laboratory Standardization Institute*.

O experimento foi realizado com cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria*

innocua CLIST 2050 e *Listeria monocytogenes* ATCC 2035), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e levedura (*Candida albicans* ATCC 10231). Foram reativadas a partir das culturas estoque em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas a 35 °C, e posteriormente suspendidas em solução de NaCl 0,9 % estéril. A turbidez desta suspensão foi ajustada no comprimento de onda de 660 nm, 75 % de transmitância, o que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Depois foi realizada uma diluição de modo a obter uma concentração em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL.

Em microplacas estéreis de 96 poços, o volume final de cada poço foi de 200 μ L, de uma mistura composta por 160 μ L de caldo Mueller-Hinton, 20 μ L da amostra diluída de forma seriada (iniciando em 10.000 μ M) e 20 μ L da suspensão do microrganismo. A microplaca foi incubada em estufa a 37 °C por 24h. Após a incubação, a leitura foi realizada com o revelador resazurina, adicionando-se 20 μ L/poço.

Alguns poços da microplaca foram utilizados para controles, como: Esterilidade do caldo Mueller Hinton (branco do meio de cultivo), do inóculo (branco do crescimento bacteriano), do solvente utilizado para o preparo da amostra (branco da amostra) e como controle positivo foi utilizado Estreptomicina para bactérias e Nistatina para a levedura.

O teste foi realizado em triplicata e a leitura foi feita pelo método visual (colorimétrico).

2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA

Levando em consideração os resultados obtidos no teste de concentração inibitória mínima, as suspensões dos poços das microplacas que não houveram crescimento microbiano foram utilizadas para a determinação da concentração microbida mínima (CMM). Portanto, após a leitura do resultado do teste anterior, 10 μ L dessas suspensões foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, em triplicata, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

As concentrações microbidas mínimas (CMM) foram consideradas como a menor concentração das amostras testadas que não permitiram crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

2.5 TOXICIDADE EM MODELO SISTÊMICO DE *G. MELLONELLA*

As larvas foram criadas no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL/MG, seguindo o protocolo criado por Jorjão *et al.* (2018), com modificações. A alimentação foi a base de uma dieta artificial composta por cera de abelha, mel, leite em pó, farinha de soja torrada, levedo de cerveja e fubá. As larvas são mantidas na incubadora BOD (Demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura controlada de 27 °C até o momento dos testes.

O efeito de toxicidade aguda foi avaliado usando o modelo de larvas de *G. mellonella*, conforme descrito por Sardi *et al.* (2017), com modificações. Quatro doses crescentes do Phtalox[®] (1, 10, 100 e 100 mg/kg) foram testadas para determinar a mínima dose capaz de matar as larvas ao longo do tempo. Para cada grupo foram selecionadas aleatoriamente 15 larvas, pesando entre 0,25 e 0,3 g, sem sinais de melanização. Dez microlitros da amostra ou do controle (Água destilada estéril) foram injetados na hemocele de cada larva através da última *proleg* usando uma Seringa Hamilton de 25 µL. As larvas foram incubadas a 27 °C e analisadas em intervalos de 12, 24, 48 e 72 horas.

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MODELO SISTÊMICO DE *G. MELLONELLA*

A atividade antimicrobiana *in vivo* foi testada frente à bactéria *S. aureus* (ATCC 6538), seguindo a metodologia proposta por Loh *et al.* (2013), com adaptações. A cepa foi reativada a partir das culturas estoque em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 h a 35 °C, e posteriormente suspensa em solução de NaCl 0,9 % estéril. A turbidez desta suspensão foi avaliada de acordo com a escala de MacFarland.

As larvas sem melanização e pesando entre 0,25g a 0,3g foram selecionadas para o teste, sendo separadas em grupos de 10 larvas. Dez microlitros do patógeno foram inoculados na larva através da última *proleg* e após uma hora, as amostras e os controles foram inoculados no mesmo local e no mesmo volume (10µL). O teste foi realizado usando a concentração de 100mg/kg de Phtalox[®], Clorexidina 0,12% e Água destilada estéril. As placas de Petri contendo as larvas foram incubadas a 35 °C, e foram realizadas avaliações nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas pós infecção.

Para avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o sistema de pontuação proposto por Loh *et al.* (2013), que se encontra na Tabela 1. Quatro parâmetros foram avaliados: Atividade, produção de cera (formação de casulo), melanização e sobrevivência. Apenas as larvas sem movimentos ao toque foram consideradas mortas.

Tabela 1 - Sistema de pontuação para avaliação das larvas de *G. mellonella*.

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade	Sem atividade	0
	Baixa atividade c/ estímulo	1
	Atividade com estímulo	2
	Atividade sem estímulo	3
Casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Completa melanização (preta)	0
	Mais de 3 pontos pretos	2
	Menos de 3 pontos pretos	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

Fonte: LOH *et al.* (2013, p. 09).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos tratados e não tratados foram comparados por meio do teste de Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados foram considerados significativos em $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E MICROBICIDA MÍNIMAS

A atividade antimicrobiana apresentada pelo Phtalox[®] utilizando os métodos de CIM e CMM podem ser observadas na Tabela 2. A concentração inicial de Phtalox[®] testada foi de 10.000 μM .

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana pelo método de CIM e CMM.

Cepas		Phtalox [®]	
		CIM	CMM
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 10.000	> 10.000
	<i>Bacillus cereus</i>	> 10.000	> 10.000
	<i>Listeria innocua</i>	> 10.000	> 10.000
	<i>Listeria monocytogenes</i>	> 10.000	> 10.000
Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	> 10.000	> 10.000
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 10.000	> 10.000
Levedura	<i>Candida albicans</i>	> 10.000	> 10.000

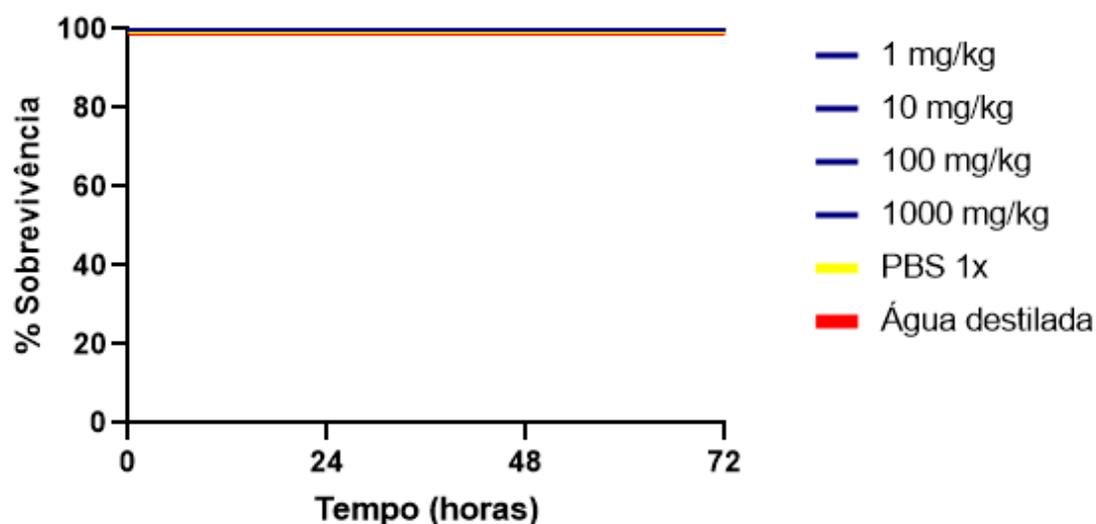
Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CMM (Concentração Microbicida Mínima).

Para os microrganismos testados e dentro das condições do método utilizado, o Phtalox[®] 10.000 µM não inibiu o crescimento de nenhum patógeno testado. Todos os controles funcionaram como esperado. Em virtude deste resultado, não foi realizado o teste de Concentração Microbicida Mínima (CMM).

3.2 TOXICIDADE EM MODELO SISTÊMICO DE *GALLERIA MELLONELLA*

O efeito tóxico agudo sistêmico do Phtalox[®] foi avaliado nas doses de 1, 10, 100 e 1000 mg/kg, conforme mostrado no gráfico de sobrevivência da Figura 1. Como controles foram utilizados PBS 1x e água destilada. O monitoramento das larvas foi realizado nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas.

Figura 1 -Toxicidade sistêmica de diferentes concentrações do Phtalox[®] usando modelo *in vivo* de *G. mellonella*.



Legenda: As larvas foram inoculadas com as doses de 1, 10, 100 e 1000 mg/kg de Phtalox[®], e os controles PBS 1x e Água destilada. A sobrevivência foi observada por 72 h ($P > 0.05$, teste Log-rank).

Não houve morte de nenhuma larva testada, inclusive na maior dosagem da amostra testada (1000 mg de Phtalox[®] por kg de larva). Como pode ser observado na Figura 2, as larvas apresentaram forte coloração verde com essa dosagem, porém isso não provocou melanização, não afetou a produção de teia e não alterou a atividade, que são três indicadores de saúde.

Figura 2 - Aparência das larvas de *G. mellonella* durante o teste de toxicidade do Phtalox® dosagem de 1000 mg/kg.

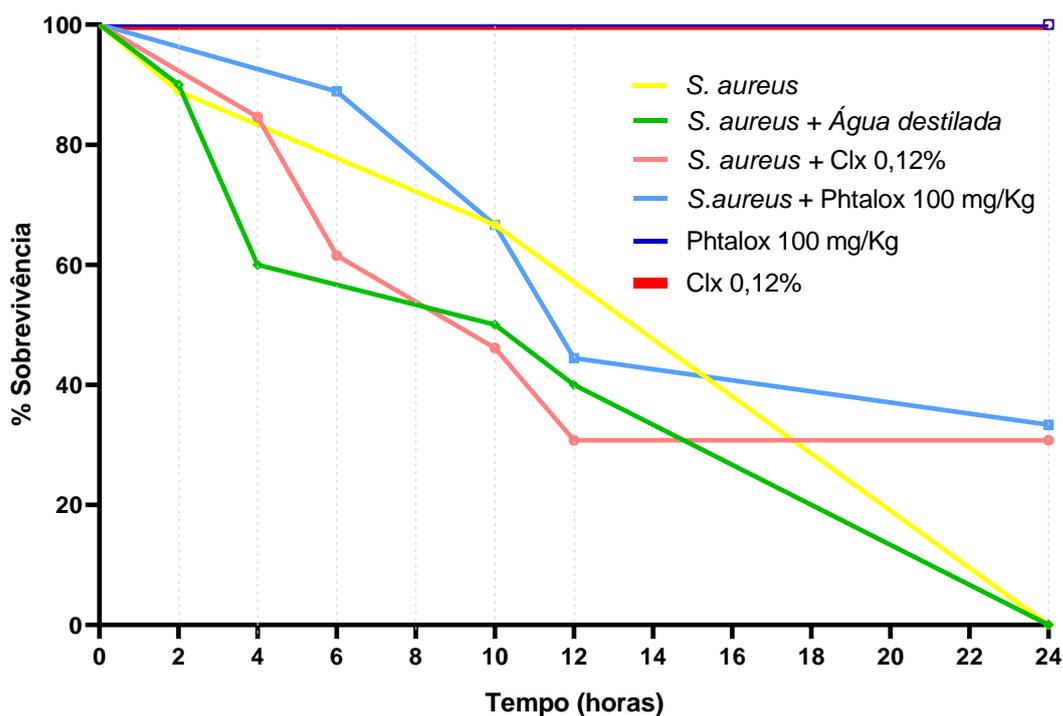


3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MODELO SISTÊMICO DE *GALLERIA MELLONELLA*

Na Figura 3, observou-se que o grupo tratado com Phtalox® apresentou uma taxa de sobrevivência de 30% após 24 horas de inoculação, resultado similar ao obtido no grupo controle positivo tratado com Clorexidina, também ilustrado na mesma figura. É importante ressaltar que a Cloredixina 0,12% representa uma dosagem de 0,0002 mg/Kg, dosagem menor que a representada pelo Phtalox® de 100 mg/Kg.

O grupo controle negativo, no qual água destilada foi utilizada, todas as larvas já estavam mortas após 12 horas de inoculação. Tanto no grupo tratado apenas com Clorexidina quanto no grupo tratado apenas com Phtalox®, nenhuma larva morreu dentro do período de 24 horas. No grupo controle constituído apenas pelo patógeno, todas as larvas morreram em até 10 horas após a inoculação.

Figura 3 - Atividade antimicrobiana do Phtalox® na dosagem de 100 mg/kg frente o patógeno *Staphylococcus aureus* utilizando o modelo de *Galleria mellonella*.

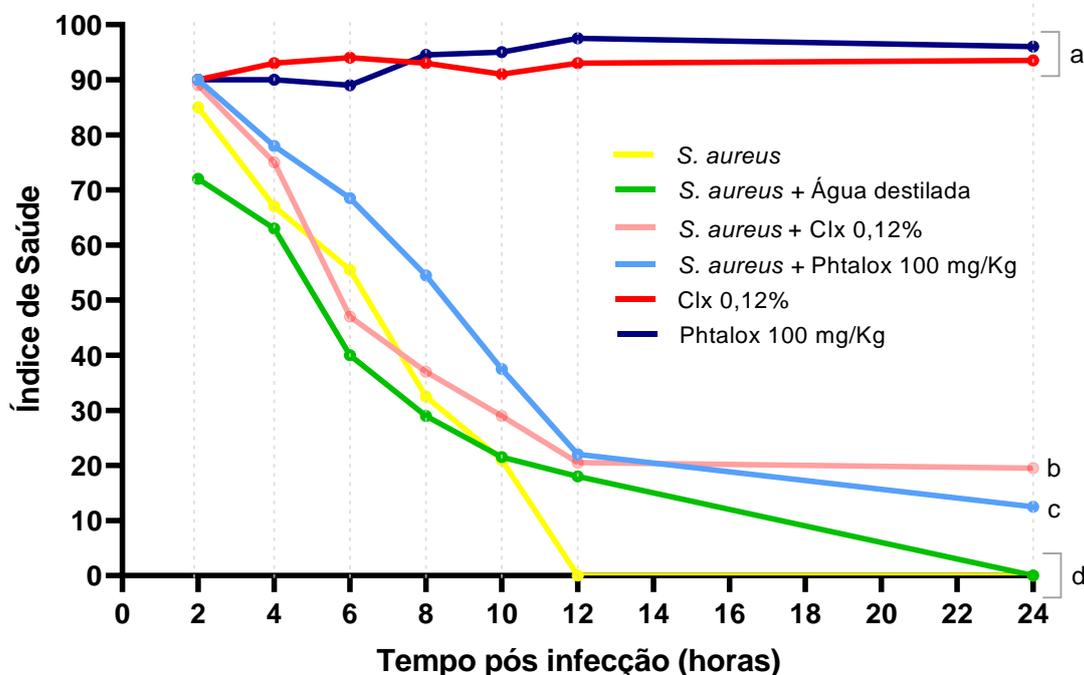


Legenda: As larvas foram inoculadas com *S. aureus* e após 1 hora de infecção foram inoculadas a amostra (Phtalox® 100 mg/kg) e os controles (Água destilada, CLX 0,12%). Também foram realizados controles sem o patógeno (Phtalox® 100 mg/kg e CLX 0,12%). A sobrevivência foi observada por 24 horas, sendo realizadas leituras de 2 em 2 horas até completar 12 horas pós infecção e uma leitura 24 horas pós infecção, representadas no gráfico pelas linhas tracejadas ($P > 0.05$, teste Log-rank).

Apesar da taxa de sobrevivência semelhante nos grupos contendo Phtalox® e Clorexidina, na Figura 4 podemos observar que, utilizando o sistema de pontuação para avaliação das larvas de *G. mellonella*, as larvas infectadas e tratadas com Phtalox® apresentaram um índice de saúde menor quando em comparação com a Clorexidina, mostrando diferença estatística.

Além disso, na mesma figura é mostrado que os grupos apenas com Phtalox® e Clorexidina, sem infecção, não apresentaram diferença estatística. E os grupos do patógeno com água destilada e apenas o patógeno também não apresentaram diferença estatística.

Figura 4 - Índice de saúde apresentados da atividade antimicrobiana do Phtalox[®] na dosagem de 100 mg/kg frente o patógeno *Staphylococcus aureus* utilizando o modelo de *Galleria mellonella*.



Legenda: Média dos índices de saúde apresentados pelas amostras testadas, após 24 horas de infecção, utilizando o sistema de pontuação para avaliação das larvas de *G. mellonella* (tabela 1). Letras diferentes indicam significância estatística por ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey ($P \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O teste CIM quantifica a menor concentração testada na qual o crescimento de um isolado é inibido por um antimicrobiano específico (ERICSSON; SHERRIS, 1971). O método possui 3 tipos de limitações: esquerda (abaixo da menor concentração antimicrobiana testada), direita (o CIM é maior do que a concentração antimicrobiana mais alta testada) e intervalo (o valor de inibição exato está entre o último intervalo que inibiu e o próximo que não inibiu) (MICHAEL; KELMAN; PITESKY, 2020). No caso, os resultados encontrados estão sendo limitados pela direita, pois o intervalo de inibição ocorre acima do testado.

Além disso, o teste é feito com bactérias planctônicas e os níveis de resistência não são fixos, podem mudar com base no ambiente e no estado

biológico da bactéria (por exemplo, planctônico, biofilme, esporo bacteriano) (FERNÁNDEZ; BREIDENSTEIN; HANCOCK, 2011; MICHAEL; KELMAN; PITESKY, 2020).

A resazurina é um corante que pode ser reduzido a resorufina na presença de atividade metabólica de células vivas, esta reação pode ser observada na mudança de cor, de azul escuro quando resazurina a rosa quando reduzido em resorufina (LAVOGINA *et al.*, 2022). O ensaio de viabilidade à base de resazurina pode ser realizado com a detecção colorimétrica, sendo o utilizado neste trabalho.

As ftalocianinas apresentam forte coloração azul esverdeada, por isso, são amplamente utilizadas na indústria de tinturaria, sendo quase um quarto de todos os pigmentos de origem orgânica relacionados a esta classe de compostos (SEKKAT *et al.*, 2012). O Phtalox[®] apresenta forte coloração também, o que resultou em uma dificuldade de leitura da redução da resazurina. Deste modo, as concentrações iniciais da diluição seriada do Phtalox[®] na microplaca foram plaqueadas em Ágar BHI para garantir que a detecção colorimétrica não estava sendo falha, mas houve crescimento normal do microrganismo.

Quando analisada a toxicidade do PHT no modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*, as larvas apresentaram forte coloração verde, devido a intensa cor da amostra, mas, apesar disso, as larvas não sofreram nenhum dano. A amostra também apresentou baixa citotoxicidade quando testada em outros modelos. Testando o PHT contra o vírus da COVID-19, SARS-COV-2, Santos P. S. S. S *et al.* (2021) utilizaram células *Vero* (ATCC CCL-81), onde a amostra apresentou baixa citotoxicidade *in vitro*.

Como a Ferro-Ftalocianina é uma nova molécula patenteada, ainda não há estudos quanto a sua toxicidade *in vivo*. Entretanto, estudos com outros derivados de ftalocianina também demonstraram que ela apresenta baixa toxicidade.

Usando Ftalocianina de zinco (II), Li *et al.* (2019) testaram a terapia fotodinâmica *in vivo* usando modelo murino. A ftalocianina foi injetada por via intravenosa em camundongos portadores de tumor HT-29, e os tumores foram expostos à radiação de laser vermelho (655 nm, 200 mW, 30 min) em 3 h pós-injeção. Os resultados foram positivos, sendo que a ftalocianina utilizada não apresentou toxicidade para os animais, além de ter desacelerado a progressão

da doença.

Também usando Ftalocianina de zinco (II), Sowa *et al.* (2021) avaliou a citotoxicidade da molécula em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), em concentrações de 1 μM e 10 μM após irradiação com luz (600 nm). Uma viabilidade celular notavelmente reduzida foi observada nos primeiros minutos de exposição à luz, porém após irradiação por 15 min, quase 80% das células morreram. Isso indica que a fototoxicidade da Ftalocianina de zinco (II) é menor na fase inicial.

O parâmetro mais frequentemente avaliado em experimentos com *G. mellonella* é a curva de sobrevivência, pois é o número de larvas que sobrevivem em função do tempo e está correlacionada com a virulência do patógeno e/ou com a eficácia do tratamento antibiótico (TSAI; LOH; PROFT, 2016; SERRANO *et al.*, 2023). Dentre os microrganismos que já foram testados em infecção contra esta larva, a *S. aureus* é a mais frequentemente utilizada, tendo um total de 164 publicações no Pubmed desde 2006 (SERRANO *et al.*, 2023), destas publicações nenhuma foi realizada utilizando ftalocianinas.

O composto candidato a antimicrobiano 1,3-dibenzil-4,5-difenil-imidazol-2-ilideno acetato de prata (I) foi avaliado quanto à sua capacidade de funcionar *in vivo* usando larvas de *G. mellonella*, onde uma dosagem de 25 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento de *S. aureus* em 71,2%, mas a partir da dosagem de 250 $\mu\text{g/mL}$ do composto houve uma redução gradativa da taxa de sobrevivência até se tornar letal na concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (BROWNE *et al.*, 2014). Portanto, a dosagem testada pode interferir na capacidade de aumentar a taxa de sobrevivência, necessitando de mais estudos testando outras dosagens de PHT.

A capacidade de vários derivados de N-fenil-1H-pirazol-4-carboxamida e outros pirazóis foi investigada utilizando *G. mellonella* para reduzir a formação do biofilme de *S. aureus*, onde alguns compostos mostraram um bom efeito protetor *in vivo*, melhorando a sobrevivência da larva quando comparado ao controle (CASCIOFERRO *et al.*, 2016).

5 CONCLUSÕES

No teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) o Phtalox[®] não

apresentou atividade frente aos microrganismos testados, nas concentrações e nas condições do método. Os testes de toxicidade *in vivo* utilizando o modelo de *G. mellonella* demonstraram que o produto não é tóxico, mesmo em altas dosagens. Além disso, por meio desse mesmo modelo, foi observado que o Phtalox® e o controle Clorexidina apresentaram taxa de sobrevivência de 30% quando exposto ao microrganismo *S. aureus*. Mas, no índice de saúde, as larvas tratadas com Clorexidina apresentaram melhores resultados do que o Phtalox®.

Essas descobertas destacam a necessidade de investigações adicionais sobre a eficácia do Phtalox® como agente antimicrobiano, bem como a importância de considerar diferentes modelos de estudo para uma avaliação abrangente de seus efeitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo número 131109/2021-9, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BOMAN, H. G., HULTMARK, D. Cell-Free Immunity in Insects. **Annual Review of Microbiology**, vol. 41, nº 1, p. 103–26, 1987.

BROWNE, N.; *et al.* Assessment of *in vivo* antimicrobial activity of the carbene silver(I) acetate derivative SBC3 using *Galleria mellonella* larvae. **Biomaterials**, v. 27, n. 4, p. 745-752, ago. 2014.

CASCIOFERRO, S.; *et al.* Synthesis and biofilm formation reduction of pyrazole-4-carboxamide derivatives in some *Staphylococcus aureus* strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 58-68, Nov. 2016.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of

yeasts.

4^a ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11^o ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2018.

ERICSSON, H.M., SHERRIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica** ;217:90, 1971.

FERNÁNDEZ, L., BREIDENSTEIN, E.B, HANCOCK, R.E. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug Resistance Updates**. Feb;14(1):1-21, 2011.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 1 mar. 2018.

LAVOGINA, D. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. **Biosensors (Basel)**. Mar 25;12(4):196, 2022.

LI, X. *et al.* Water-Soluble Phthalocyanines Selectively Bind to Albumin Dimers: A Green Approach Toward Enhancing Tumor-Targeted Photodynamic Therapy. **Theranostics**. Aug 14;9(22):6412-6423, 2019.

LOH, J. M. S, *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *streptococcus*. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.

MÉNARD, G. *et al.* *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 11, 2021.

MICHAEL, A., KELMAN, T., PITESKY, M. Overview of Quantitative Methodologies to Understand Antimicrobial Resistance via Minimum Inhibitory Concentration. **Animals (Basel)**;10(8):1405, 2020.

NEAMTU, M *et al.* Iron Phthalocyanine-Sensitized Magnetic Catalysts for BPA Photodegradation. **Scientific Reports**, vol. 10, no 1, p. 5376, 2020.

ORCINA, B. F. *et al.* A Phthalocyanine Derivate Mouthwash to Gargling/Rinsing as an Option to Reduce Clinical Symptoms of COVID-19: Case Series. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 47–50, 2021.

POLETI, M. L. *et al.* Use of mouthwash and dentifrice containing an antimicrobial phthalocyanine derivative for the reduction of clinical symptoms of COVID-19: a randomized triple-blind clinical trial. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**. 22, p. 101777, 2022.

SANTOS, C. *et al.* Virucidal Activity of the Antiseptic Mouthwash and Dental Gel Containing Anionic Phthalocyanine Derivative: In Vitro Study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 269–74, 2021.

SANTOS, P. S. S. *et al.* Beneficial Effects of a Mouthwash Containing an Antiviral Phthalocyanine Derivative on the Length of Hospital Stay for COVID-19: Randomised Trial. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19937, 2021.

SARDI, J. C. O. *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280 – 287, 2017.

SEKKAT N., *et al.* Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. **Molecules**. Dec 23;17(1):98-144, 2012.

SERRANO, I.; *et al.* The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific

Experimentation. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, n. 3, p. 505, mar. 2023.

SOWA A., *et al.* Umbelliferone Decorated Water-soluble Zinc (II) Phthalocyanines - In Vitro Phototoxic Antimicrobial Anti-cancer Agents. **Chemistry**. Oct 21;27(59):14672-14680, 2021.

TEODORO, G. R. *et al.* PHTALOX® antimicrobial action and cytotoxicity: in vitro study. **J Dent Res 99(Spec Iss A)**: abstract number, 0839, 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA).

TSAI, C. J. *et al.* *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

VENTOLA, CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, Apr;40(4):277-83, 2015.

3.2 ARTIGO II – Ftalocianina inibe o crescimento de bactérias presentes na doença periodontal: Estudo *in vitro*

FTALOCIANINA INIBE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PRESENTES NA DOENÇA PERIODONTAL: ESTUDO *IN VITRO*

Rafaela Franco Dias Bruzadelli¹, Bruno Bueno Silva², Tatiane Tiemi Macedo²; Pedro Luiz Rosalen¹; Marcelo Franchin³, Fabiano Vieira Vilhena⁴, Leandro Araújo Fernandes³, Masaharu Ikegaki¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, MG, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Odontologia - Universidade Guarulhos

³Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

⁴TRIALS – Saúde Bucal & Tecnologias

Resumo

Investigou-se a atividade da Ftalocianina de Ferro - PHTALOX[®] (PHT) na inibição do crescimento de 33 espécies bacterianas presentes na doença periodontal. O modelo de biofilme multiespécies foi desenvolvido usando o dispositivo *Calgary* e incubado a 37°C sob anaerobiose. O biofilme formado foi tratado com PHT duas vezes por dia, por um minuto, durante quatro dias, nas concentrações variando de 1.000 a 10.000 µM. Como controle foi utilizada a base farmacológica Clorexidina a 0,12% (2.374 µM) (CLX) e o veículo da diluição (PBS). Após 7 dias, foi realizada a quantificação da atividade metabólica do biofilme usando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), para diferenciação das células metabolicamente ativas das inativas. Por fim, utilizando o método *Checkerboard*, foi realizada a hibridização DNA-DNA do biofilme tratado. De acordo com os resultados, o PHT 10.000 µM e a CLX diferiram estatisticamente do controle do biofilme reduzindo a contagem bacteriana total, e não diferiram entre si ($p > 0,05$). Além disso, o PHT 10.000 µM apresentou significância estatística quando comparada ao controle em 7 microrganismos. Conclui-se que o PHT apresenta um efeito promissor na inibição de bactérias presentes na doença periodontal, principalmente por inibir o crescimento de patógenos-chave, como a *P. gingivalis*.

Palavras-chaves: Biofilme; Ftalocianina de Ferro; *Porphyromonas gingivalis*.

1 INTRODUÇÃO

O microbioma oral é uma das comunidades microbianas mais importantes e complexas do corpo humano, onde mais de 700 tipos de microrganismos podem ser colonizados (PENG *et al.*, 2022). Em sistemas biológicos, as bactérias são frequentemente observadas em biofilmes, que são conjuntos de células microbianas ligadas umas às outras e/ou a uma superfície, envolta por uma matriz autoproduzida, o que garante uma maior resistência aos microrganismos ali presentes (PENESYAN *et al.*, 2021). Por isso, os biofilmes são difíceis de tratar com o uso de antibióticos por vários motivos, tais como penetração retardada do antimicrobiano na matriz extracelular do biofilme, desaceleração da taxa de crescimento de organismos dentro do biofilme ou outras alterações fisiológicas provocadas pela interação dos organismos com uma superfície (DONLAN, 2000; HAQUE *et al.*, 2022).

Em um indivíduo saudável, as bactérias orais existem em equilíbrio natural com o hospedeiro. Diferentes fatores, como tabagismo, diabetes, predisposição genética ou má higiene dental, podem fazer com que a comunidade se torne disbiótica, permitindo que bactérias potencialmente patogênicas aumentem em número e causem infecções persistentes, como a doença periodontal (BLOCH *et al.*, 2019).

A doença periodontal é caracterizada pela deterioração gradual dos tecidos moles e duros do complexo periodontal, mediada por uma interação entre comunidades microbianas disbióticas e respostas imunes exacerbadas nos tecidos gengivais e periodontais (SEDGHI; BACINO; KAPILA, 2021).

O biofilme oral pode conter diversos táxons bacterianos, que foram classificados por Socransky *et al.* (1998) em um modelo abrangente de interações multiespécies para a doença periodontal, com base na sua virulência e transição saúde-doença. Neste agrupamento por cor, os primeiros biofilmes são considerados saudáveis e não causam doenças, sendo eles o complexo azul, onde estão as espécies de *Actinomyces*, o complexo amarelo composto por vários *Streptococcus spp.*, e o complexo roxo composto principalmente por *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*, que possibilitam posterior colonização por integrantes do complexo verde, como *Capnocytophaga sp.*, *Eikenella sp.* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Caso não sejam interrompidos, os biofilmes saudáveis podem criar condições que favorecem a colonização de espécies do complexo laranja, que está relacionado à transição saúde-doença, pois pode favorecer a colonização por espécies do complexo vermelho (MIRANDA *et al.*, 2019). As bactérias do complexo vermelho são *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, sendo consideradas os principais patógenos da doença periodontal, pois geralmente aparecem juntas e estão relacionadas ao aumento da gravidade da doença (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

A clorexidina, apesar de ser considerada padrão ouro para o tratamento de suporte atualmente, possui efeitos adversos devido ao uso prolongado (HAQUE *et al.*, 2022), como pigmentação dos tecidos moles orais e dentes e alteração do paladar (STEFANO *et al.*, 2022). Além disso, a resistência microbiana em bactérias causadoras da doença periodontal é uma preocupação crescente em todo o mundo (RAMS; DEGENER; WINKELHOFF, 2014). Portanto, faz-se necessário a busca por novos compostos antimicrobianos capazes de atuar no biofilme periodontal.

O Phtalox[®] (PHT) é uma ferro-ftalocianina modificada que apresenta carboxilas em suas extremidades e ferro em seu centro. Este composto pode promover autoativação e produção contínua de oxigênio reativo na presença de oxigênio molecular (POLETI *et al.*, 2022). Há poucos estudos quanto à sua atividade antimicrobiana, mas os existentes indicam o seu potencial contra *Streptococcus mutans* (TEODORO *et al.*, 2020). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades anti-biofilme do PHT em um modelo de biofilme multiespécie subgingival *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO PHTALOX[®]

O desenvolvimento dos estudos envolvendo o Phtalox[®] tem como parceria a empresa TRIALS - Saúde Bucal & Tecnologias através do edital da CNPq nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação MAI/DAI, onde essa molécula derivada de uma ftalocianina possui patente requerida e está sob sigilo. O Phtalox[®] foi fornecido pela empresa TRIALS e a sua dissolução foi realizada com tampão PBS 1x.

2.2 MODELO DE BIOFILME MULTIESPÉCIES

As culturas de biofilmes multiespécies foram preparadas conforme descrito por Soares *et al.* (2015). As 33 espécies bacterianas incluídas no modelo de biofilme estão listadas na tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

Para cultivar a maioria das espécies em câmara de anaerobiose (85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de hidrogênio) foi utilizado o ágar Triptona de Soja com 5% de sangue de carneiro (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA). *E. nodatum* foi cultivado em ágar anaeróbico fastidioso com 5% sangue de carneiro. *P. gingivalis* foi cultivada em ágar Triptona de Soja contendo extrato de levedura enriquecido com 1% de hemina (Sigma), 5% de menadiona (Sigma) e 5% de sangue de carneiro. *T. forsythia* foi cultivada em ágar Triptona de Soja contendo extrato de levedura enriquecido com 1% de hemina, 5% de menadiona, 5% de sangue de carneiro e 1% de ácido N-acetilmurâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Todas as espécies cresceram em placas de Petri por 48 horas e depois foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura BHI (Becton Dickinson, Sparks, MD) suplementado com 1% de hemina. Após 24 horas de crescimento, a densidade óptica (DO) a 600 nm foi ajustada para 0,1, correspondendo a cerca de 10^8 células/mL de cada uma das espécies. As suspensões de células individuais de cada espécie foram diluídas para 10^7 células/mL, com ajustamento para os seus respectivos tamanhos de células. Alíquotas de 100 µL contendo 10^6 células de cada uma das espécies foram misturados com 11,7 mL de BHI com 1% de hemina e 5% de sangue de carneiro para se obter um inóculo final de biofilme no volume de 15 mL.

Tabela 1 - Lista de espécies bacterianas cultivadas no biofilme multiespécies.

Complexo microbiano	Espécies bacterianas
Actinomyces	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104
	<i>Actinomyces oris</i> ATCC 43146
	<i>Actinomyces gerencseriae</i> ATCC 23860
	<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102
Amarelo	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556
	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037
	<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335
	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456
Roxo	<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790
	<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17929
Verde	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523
	<i>Capnocytophaga ochracea</i> ATCC 33596
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624
	<i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834
	<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612
Laranja	<i>Campylobacter showae</i> ATCC 51146
	<i>Eubacterium nodatum</i> ATCC 33099
	<i>Fusobacterium nucleatum vincentii</i> ATCC 49256
	<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270
	<i>Fusobacterium nucleatum polymorphum</i> ATCC 10953
	<i>Fusobacterium periodonticum</i> ATCC 33693
	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611
	<i>Streptococcus constellatus</i> ATCC 27823
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236

Vermelho	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 <i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037
Outras	<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>Selenomonas noxia</i> ATCC 43541 <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827 <i>Gemella morbillorum</i> ATCC 27824 <i>Eubacterium saburreum</i> ATCC 33271

Fonte: Adaptado de MIRANDA *et al.* (2019).

Legenda: As cepas foram categorizadas nos complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998).

O modelo de biofilme multiespécie foi desenvolvido usando um dispositivo de biofilme *Calgary* (CBD) em uma placa de 96 poços. Uma alíquota de 150 µL de cada inóculo foi adicionada aos poços e correspondeu a $\sim 1 \times 10^4$ células de cada cepa bacteriana, exceto para *P. gingivalis* e *P. intermedia*, cujos inóculos foram ajustados para 2×10^4 células. Uma tampa contendo pinos de poliestireno foi usada para selar a placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C sob condições anaeróbias. No terceiro dia, o meio exaurido nutricionalmente (caldo BHI com 1% de hemina e 5% de sangue de ovelha) foi substituído e as culturas de biofilmes foram mantidas a 37 °C sob condições anaeróbias por mais quatro dias para obter biofilmes de sete dias (SOARES *et al.*, 2015).

2.3 TRATAMENTO DO BIOFILME COM PHT

As culturas de biofilme foram tratadas com o PHT após a formação do biofilme por 72 h (no terceiro dia após a substituição do meio exaurido), conforme metodologia descrita por Soares *et al.* (2015). As placas foram tratadas duas vezes por dia durante os quatro dias seguintes. Os pinos revestidos com o biofilme foram transferidos para placas de 96 poços contendo diferentes concentrações da amostra (1000, 2500, 3000, 5000, 7500 e 10000 µM), o veículo de diluição PBS 1x (controle negativo) e clorexidina 0,12%, e permaneceu em contato com os tratamentos por 1 minuto.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFIME

Os efeitos do PHT e dos controles na atividade metabólica das células do biofilme multiespécie foram medidos em um ensaio espectrofotométrico usando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), conforme descrito por Soares *et al.* (2015). O TTC é usado para diferenciação entre células metabolicamente ativas das inativas, pois ele é enzimaticamente reduzido a vermelho formando 1,3,5-trifenil nas células vivas devido à atividade de várias desidrogenases. A mudança na cor do substrato é uma medida indireta da atividade metabólica bacteriana.

Para medir a atividade metabólica dos biofilmes, os pinos foram transferidos para placas de 96 poços com 200µL/poço de meio BHI fresco suplementado com 1% de hemina e 10% de uma solução de 1% de TTC. As placas foram incubadas em condições anaeróbias por 24 h a 37 °C. A redução do TTC foi lida a 485 nm usando um espectrofotômetro.

2.5 HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA (MÉTODO CHECKBOARD)

Três pinos revestidos com biofilme de sete dias de cada grupo foram lavados em PBS e transferidos para microtubos tipo Eppendorf, contendo 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)), seguido pela adição de 100 µL de NaOH 0,5M. Os tubos contendo os pinos e a solução final foram fervidos por 10 min e a solução foi neutralizada com 0,8 mL de amônia 5 M. As amostras foram analisadas individualmente quanto à presença e quantidade de 33 espécies bacterianas usando a técnica de hibridação DNA-DNA.

As amostras de biofilme foram lisadas e o DNA correspondente foi colocado em uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva usando um dispositivo Minislot (Immunelect, Cambridge, MA, EUA) e fixado na membrana a 120 °C por 20 minutos. Após a fixação à membrana, as amostras de DNA foram colocadas em um Miniblotter 45 (Immunelect). As sondas de DNA marcadas com Digoxigenina de todo o genoma das espécies bacterianas foram hibridizadas com as linhas individuais do Miniblotter 45. As membranas foram lavadas e as sondas de DNA foram detectadas usando um anticorpo específico contra digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina. Os sinais foram detectados usando o substrato AttoPhos (Amersham Life Sciences, Arlington

Heights, IL, EUA) e os resultados foram obtidos usando o Typhoon Trio Plus (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EUA). Duas linhas em cada execução continham padrões com 10^5 e 10^6 células de cada cepa. Os sinais obtidos com o Typhoon Trio foram convertidos em contagens absolutas por comparação com os padrões da mesma membrana (Tabela 2). Estes registros então foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo (SOARES *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival.

Índice	Nível do microrganismo
0	Sem detecção do sinal
1	Menos de 10^5 células
2	Aproximadamente 10^5 células
3	Entre 10^5 e 10^6 células
4	Aproximadamente 10^6 células
5	Mais de 10^6 células

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados de atividade metabólica, adotou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA – one way) para experimentos com Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). O teste post-hoc para distinção dos tratamentos e repetições foi o Teste de Tukey. Para ambos os testes foi adotada $\alpha = 5\%$, e utilizado o pacote “ExpDes.pt” (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUERA, 2014).

Os dados de composição microbiana (Hibridização DNA-DNA) foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Um nível de significância de 5% foi considerado em todos os testes estatísticos.

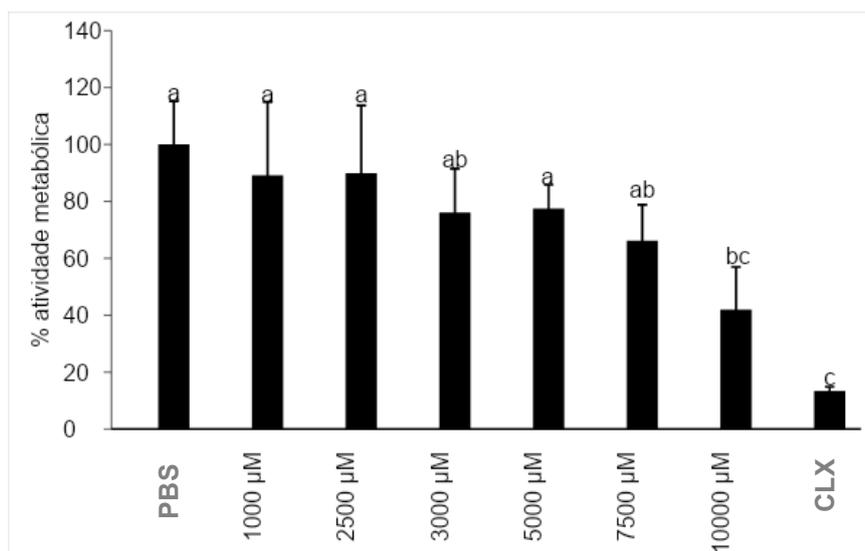
3 RESULTADOS

3.1 ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME

A Figura 1 mostra os valores obtidos a partir da avaliação da atividade

metabólica dos biofilmes tratados com o PHT em diferentes concentrações, veículo de diluição (PBS) e clorexidina (CLX).

Figura 1 - Atividade metabólica de biofilmes multiespécies tratados com veículo da diluição, PHT a 1.000, 2.500, 3.000, 5.000, 7.500 e 10.000 μM e clorexidina 0,12%.

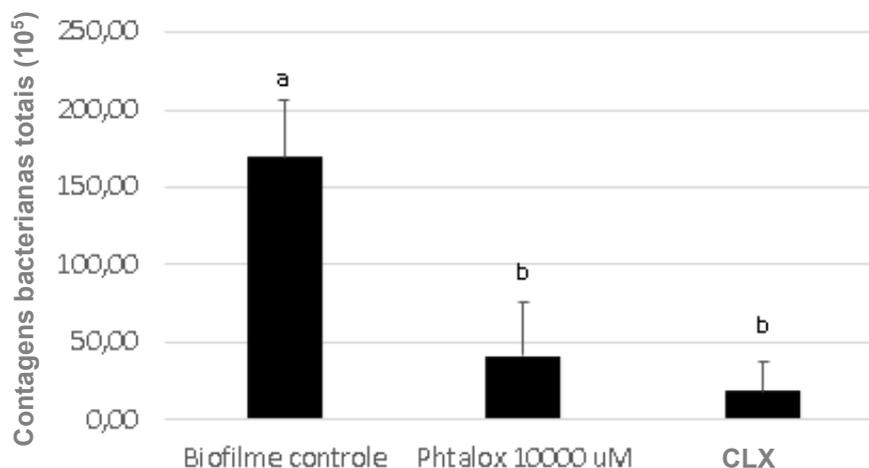


Legenda: Os biofilmes tratados com veículo da diluição (PBS) foram considerados como tendo 100% de atividade metabólica, sendo o controle negativo. A clorexidina 0,12% (CLX) foi considerada o controle positivo. Letras diferentes indicam significância estatística por ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve diferença estatística entre o controle do biofilme e as concentrações de 1000, 2500, 3000, 5000 e 7500 μM de Phtalox[®]. Apenas a concentração de 10000 μM diferiu estatisticamente do controle negativo, reduzindo para 40% a atividade metabólica do biofilme. Além disso, esta concentração não apresentou diferença estatística com a Clorexidina 0,12%, que reduziu para cerca de 20% a atividade metabólica.

Por isso, a análise com o biofilme multiespécie foi realizada utilizando apenas a maior concentração (10000 μM) de Phtalox[®], além do veículo de diluição e da clorexidina 0,12%. A Figura 2 mostra as contagens totais de todos os microrganismos incluídos no experimento de biofilme.

Figura 2 - Contagens bacterianas totais (10^5) em biofilmes tratados com veículo de diluição (controle negativo), Phtalox[®] a 10.000 μM e clorexidina a 0,12%.



Legenda: Letras diferentes indicam significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunnnett ($P \leq 0,05$).

O Phtalox[®] na concentração de 10.000 μM e a Clorexidina 0,12% diferiram estatisticamente do controle do biofilme pois reduziram a contagem bacteriana total, porém não diferiram entre si.

Deve-se levar em conta que a Clorexidina 0,12% representa uma concentração de 2.374 μM , abaixo da concentração do PHT a 10.000 μM , portanto, apesar do resultado sem diferença estatística, reduziu a contagem bacteriana total com uma menor concentração. Além disso, na Figura 3 pode-se observar que a Clorexidina apresentou uma redução maior em número de microrganismos.

3.2 HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA

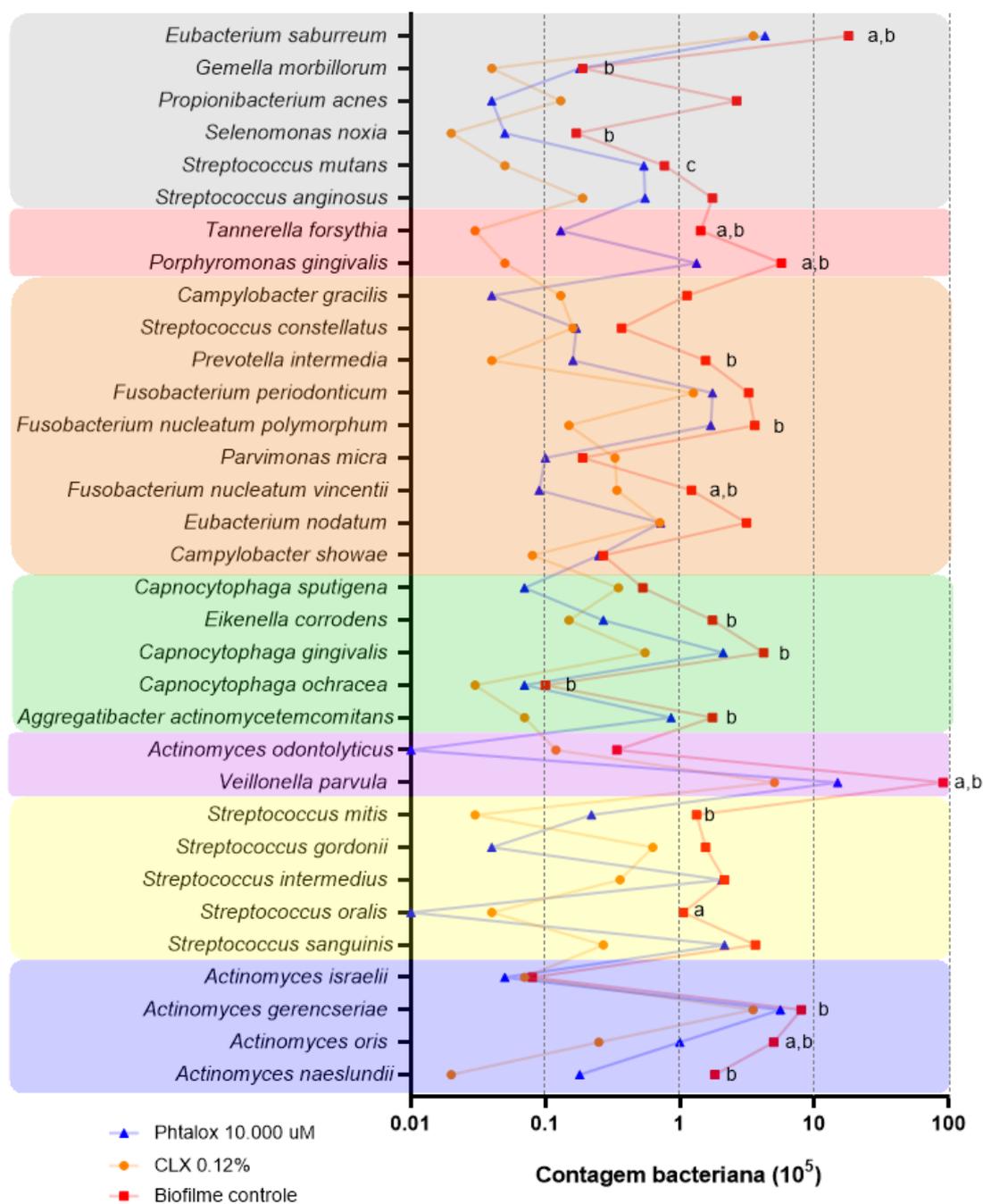
A Figura 3 apresenta as contagens médias de cada cepa com base na hibridização *checkerboard* DNA-DNA.

A redução nas contagens gerada pela a concentração de 10.000 μM de Phtalox[®] apresentou significância estatística quando comparada ao controle nos seguintes microrganismos: *A. oris*, *S. oralis*, *V. parvula*, *F. nucleatum vincentii*, *E. saburreum* e as bactérias do complexo vermelho *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

Os microrganismos significativamente reduzidos após o tratamento com

Clorexidina a 0,12% comparado ao controle incluem *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. israelii*, *S. mitis*, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis*, *E. corrodens*, *F. nucleatum vincentii*, *F. nucleatum polymorphum*, *P. intermedia*, *S. noxia*, *G. morbillorum*, *E. saburreum* e as bactérias do complexo vermelho *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

Figura 3 - Contagens bacterianas médias (10^5) tratados com veículo de diluição (controle biofilme), Phtalox® a 10.000 μ M e Clorexidina 0,12%.



Legenda: As bactérias foram agrupadas segundo os complexos propostos por Socransky *et al.* (1998), sendo Actinomyces (azul); Amarelo, Roxo, Verde, Laranja, Vermelho e outros (cinza). Gráfico formado pelo GraphPad Prism, analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn para cada espécie bacteriana separadamente. (a) significância estatística entre biofilmes tratados com Phtalox[®] e controle. (b) significância estatística entre biofilmes tratados com CLX e controle. (c) significância estatística entre os biofilmes tratados com Phtalox[®] e CLX.

4 DISCUSSÃO

O PHT, na concentração de 10.000 μM , foi tão eficaz estatisticamente quando a CLX na concentração de 2.374 μM na redução geral da formação do biofilme multiespécies. Além disso, ambas as substâncias reduziram as contagens médias de alguns microrganismos, incluindo patógenos periodontais importantes, como a *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

Para *S. oralis* e *A. odontolyticus*, o PHT gerou contagem bacteriana mínima, sendo os melhores resultados para a amostra, apesar de não possuir diferença estatística com a CLX. Ambos microrganismos estão presentes na microbiota oral residente de indivíduos saudáveis de todas as idades, porém *S. oralis* pode atuar aumentando a virulência de membros potencialmente prejudiciais da microbiota, como a *P. gingivalis* (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021).

O único microrganismo testado que o controle positivo (CLX) apresentou diferença estatística do PHT foi *S. mutans*, onde a amostra estudada obteve um resultado inferior quando comparado ao padrão-ouro. Para todas as outras bactérias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os biofilmes tratados com Clorexidina e Phtalox[®].

S. mutans é considerado um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária (LOESCHE, 1986). Teodoro *et al.* (2020) avaliou o efeito inibitório do Phtalox[®] contra células planctônicas de *S. mutans* (ATCC 25175), uma suspensão bacteriana de 10^8 células/mL foi exposta a amostra e ao controle (Fluoreto de Sódio - NaF) por 1, 3 e 5 minutos, onde o Phtalox[®] mostrou uma redução estatística mais significativa do que o NaF. Como pode-se observar na Figura 3, *S. mutans* foi o único microrganismo que apresentou significância estatística entre PHT e CLX, sendo a última com um melhor resultado, e o PHT com baixa redução de contagem de células. No entanto, esse resultado foi obtido por meio da utilização de biofilme multiespécie. É importante ressaltar que as

células bacterianas presentes em um biofilme podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos do que as células planctônicas (DONLAN, 2000; URUÉN et al., 2020; RAO et al., 2021).

O complexo laranja está correlacionado com a mudança no estado saúde-doença, uma vez que as espécies desse complexo geram condições benéficas para as espécies do complexo vermelho se estabelecerem e terem sucesso no microbioma subgengival (FIGUEIREDO et al., 2022). Portanto, é interessante a inibição deste complexo, mas o PHT a 10.000 µM conseguiu inibir apenas a bactéria *F. nucleatum vincentii*. Este patógeno é uma espécie importante na interação física entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (CHEN et al., 2022), onde a co-infecção causada por ele e *P. gingivalis* ou *T. forsythus* pode estimular a resposta imune do hospedeiro e induzir a perda óssea alveolar (SETTEM et al., 2012).

P. gingivalis e *T. forsythia* são considerados responsáveis pela disbiose no microbioma oral (MIRANDA et al., 2019) e são eles que iniciam os mecanismos de evasão bacteriana do sistema imunológico (HAJISHENGALLIS, 2015). O ensaio de hibridação DNA-DNA revelou que o tratamento com Phtalox® a 10.000 µM reduziu os níveis de *P. gingivalis* e *T. forsythia* quando comparado ao controle, sem diferença significativa da Clorexidina.

Dobson; Wilson (1992) testaram a ação antimicrobiana da Ftalocianina Sulfonada de Alumínio contra bactérias presentes no biofilme da doença periodontal (*S. sanguis* NCTC 10904, *P. gingivalis* W50, *F. nucleatum* NCTC 10562 e *A. actinomycetemcomitans* Y4) e obtiveram bons resultados, não constatando crescimento bacteriano. Porém, ao contrário da Ferro-Ftalocianina, a Ftalocianina Sulfonada de Alumínio necessita ser fotoativada, no caso, os autores usaram exposição à luz de laser de Hélio/Neon (7,3 mW) por 30 segundos.

Também utilizando uma Ftalocianina que necessita ser autoativada, Wood et al. (1999) testaram a Ftalocianina Zinco (II) irradiada com luz branca contra biofilmes multiespécies de 8 voluntários diagnosticados com doença periodontal. Utilizando microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que a Ftalocianina Zinco (II) é absorvida pela biomassa do biofilme e provoca morte celular significativa causada por essa terapia fotodinâmica.

Derivados de ftalocianinas já foram testados contra diversos microrganismos que não estão relacionados à doença periodontal. Mantareva *et al.* (2022a) testaram uma Ftalocianina de Paládio e uma de Zinco, ambas fotoativadas com luz LED, frente a *Flavobacterium hydatis*, através do método de difusão em disco. A Ftalocianina de Zinco se mostrou mais eficaz na fotoativação dos isolados bacterianos quando comparada ao de Paládio, porém ambos apresentaram bons resultados. Em teste semelhante, Mantareva *et al.* (2022b) testaram as mesmas ftalocianinas frente a outra bactéria, *Aeromonas hydrophila*, onde pode-se concluir que tanto a cepa resistente quanto a sensível podem ter seu crescimento inibido com o uso destas ftalocianinas em concentrações acima de 5 µM por irradiação com uma fonte de luz de 665 nm.

No estudo de Ziental *et al.* (2022), o complexo de Ftalocianina Paládio (II), ativado com luz na faixa de 730-740 nm emitida por painel de LEDs, apresentou a maior atividade bactericida contra todos os microrganismos resistentes a antibióticos estudados (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli* (cepa clínica), *Candida auris* (DSM 21092), *Candida albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 10231), *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533)).

Apesar de bons resultados, todos estes derivados de ftalocianinas necessitam de ativação por luz. A terapia fotodinâmica antibacteriana é uma abordagem promissora para tratar infecções bacterianas resistentes aos antibióticos, porém ainda requer mais ensaios clínicos (LIU *et al.*, 2015).

5 CONCLUSÕES

O Phtalox® 10.000µM foi tão eficaz estatisticamente quanto a Clorexidina 0,12% na redução da formação geral do biofilme multiespécie subgingival *in vitro*. Inclusive para as bactérias do complexo vermelho *P. gingivalis* e *T. forsythia*, patógenos responsáveis pelo aumento da gravidade da doença. Novos estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para determinar a eficácia do PHT como um tratamento adjuvante para a doença periodontal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo número 131109/2021-9, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARCHAMBAULT, L., *et al.* Understanding *Lactobacillus paracasei* and *Streptococcus oralis* Biofilm Interactions through Agent-Based Modeling. **mSphere**. Dec 22;6(6): e0087521, 2021.
- BLOCH, S. *et al.* Nonulosonic acids contribute to the pathogenicity of the oral bacterium *Tannerella forsythia*. **Interface Focus**. Apr 6;9(2):20180064, 2019.
- CHEN Y., *et al.* More Than Just a Periodontal Pathogen - the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Feb 3; 12:815318, 2022.
- DOBSON J., WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**; 37:883–887, 1992.
- DONLAN, R.M. Role of biofilms in antimicrobial resistance. **ASAIO Journal**. Nov-Dec; 46 (6): S47-52, 2000.
- FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, v. 5, p., 2952-2958, 2014.
- FIGUEIREDO, L. C. *et al.* Propolis, Aloe Vera, Green Tea, Cranberry, Calendula, Myrrha and Salvia Properties against Periodontal Microorganisms. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2172, 2022.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**. Jan;15(1):30-44, 2015.

HAQUE, M.M., *et al.* Advances in novel therapeutic approaches for periodontal diseases. **BMC Oral Health**. Nov 15;22(1):492, 2022.

LIU Y., *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**. Dec 1;1(3):140-167, 2015.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiology Reviews**. Dec;50(4):353-80, 1986.

MANTAREVA, V. *et al.* Palladium Phthalocyanines Varying in Substituents Position for Photodynamic Inactivation of *Flavobacterium hydatis* as Sensitive and Resistant Species. **Current Issues in Molecular Biology**. Apr 29;44(5):1950-1959, 2022a.

MANTAREVA, V. *et al.* Photodynamic Inactivation of Antibiotic-Resistant and Sensitive *Aeromonas hydrophila* with Peripheral Pd (II)- vs. Zn (II)-Phthalocyanines. **Biomedicines**. Feb 5;10(2):384, 2022b.

MIRANDA, S. L. F. *et al.* Brazilian Red Propolis Reduces Orange-Complex Periodontopathogens Growing in Multispecies Biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 308–19, 2019.

PENESYAN, A. *et al.* Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. **Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, 10 nov. 2021.

PENG, X. *et al.* Oral microbiota in human systematic diseases. **International Journal of Oral Science**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2 mar. 2022.

POLETI, M. L. *et al.* Use of mouthwash and dentifrice containing an antimicrobial phthalocyanine derivative for the reduction of clinical symptoms of COVID-19: a randomized triple-blind clinical trial. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**. 22, p. 101777, 2022.

RAMS, T. E., DEGENER, J. E., van WINKELHOFF A. J. Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota. **Journal of Periodontology**. 85 (1), 160–9., 2014.

RAO H., *et al.* Approaches for Mitigating Microbial Biofilm - Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. **Molecules**. Mar 26;26(7):1870, 2021.

SEDGHI L.M., BACINO M., KAPILA Y.L. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 7; 11:766944, 2021.

SETTEM, R.P. *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. **Infection and Immunity Journal**. Jul;80(7):2436-43, 2012.

SOARES, G. M. S., *et al.* Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an In Vitro Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2791–98, 2015.

SOCRANSKY, S. S., *et al.* Microbial Complexes in Subgingival Plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, vol. 25, n. 2, p. 134–44, 1998.

STEFANO, M. *et al.* Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no 9, p. 5142, 2022.

TEODORO, G. R. *et al.* PHTALOX® antimicrobial action and cytotoxicity: *in vitro* study. **J Dent Res 99(Spec Iss A)**: abstract number, 0839, 2020
IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA).

URUÉN C., *et al.* Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibiotics**. Dec 23;10(1):3, 2020.

WOOD, S. *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**; 50:1–7, 1999.

ZIENTAL D. *et al.* Zinc (II), Palladium (II), and Metal-Free Phthalocyanines Bearing Nipagin-Functionalized Substituents against *Candida auris* and Selected Multidrug-Resistant Microbes. **Pharmaceutics**. 12;14(8):1686, 2022.

4 CONCLUSÕES

Embora o Phtalox[®] não tenha apresentado bons resultados no teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os microrganismos testados e nas condições do método, os testes de toxicidade *in vivo* utilizando o modelo de *G. mellonella* revelaram que o produto não é tóxico, mesmo em altas dosagens. Além disso, por meio desse mesmo modelo, observou-se que o Phtalox[®] não apresentou diferença estatística em relação ao controle Clorexidina quando exposto ao microrganismo *S. aureus*.

Vale ressaltar que o Phtalox[®] 10.000µM foi estatisticamente tão eficaz quanto a Clorexidina 0,12% na redução da formação geral do biofilme multiespécie subgengival *in vitro*, inclusive contra as bactérias do complexo vermelho *P. gingivalis* e *T. forsythia*, patógenos responsáveis pelo agravamento da doença periodontal.

Diante disso, sugere-se a realização de novos estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* para determinar a eficácia do Phtalox[®] como tratamento adjuvante para a doença periodontal. Essas investigações adicionais são cruciais para aprimorar nossa compreensão sobre o potencial terapêutico do Phtalox[®] e, potencialmente, oferecer novas opções de tratamento para a doença periodontal. A abordagem de considerar diferentes modelos de estudo permite uma análise mais abrangente de sua eficácia e segurança. Portanto, é fundamental pesquisas para investigar novos compostos antimicrobianos, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas e direcionadas para o combate de doenças.

5 PRODUTOS E COLABORAÇÕES

Durante os 24 meses do período de mestrado recebi bolsa, por isso, fiz questão de aproveitar todas as oportunidades possíveis que a universidade e o Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas ofereceram.

Atuei no Museu de Memória e Patrimônio da UNIFAL-MG, no espaço Ciência, como monitora dos projetos “Macrocélula” e “Construindo células” recebendo alunos das escolas da região de ensino médio e fundamental I e II. Além da experiência profissional como professora que adquiri, também houveram produtos gerados. Três artigos estão sendo escritos sobre os projetos do museu, que serão submetidos em revistas brasileiras qualis A1. Outros três trabalhos foram apresentados, na forma de apresentação oral, no “1º Congresso Internacional Multidisciplinar”.

Fui coorientadora da iniciação científica da aluna Vitória Capuano intitulada “Estudo da atividade antimicrobiana de extratos fúngicos para posterior aplicação em diferentes segmentos industriais” pelo edital 17/2021 da chamada estendida para submissão de planos de trabalho de iniciação científica e iniciação tecnológica do PIBICT/FAPEMIG. Além da bolsa de iniciação científica vinculada a chamada MAI/DAI 2020 - Chamada CNPq N° 12/2020, com o projeto “Determinação da atividade antimicrobiana e da toxicidade do Phtalox® em modelos *in vitro* e *in vivo*”, do aluno Leonardo Pereira de Araújo.

Particpei como coorientadora do trabalho de conclusão de curso da aluna Sidineia Evangelista Bento Araújo intitulado “Composição química, atividade biológica e toxicidade *in vivo* do extrato etanólico de geoprópolis da abelha *Trigona sp*”.

Logo após o meu exame de qualificação, fui banca do trabalho de conclusão de curso da aluna Larissa Almeida Sales, intitulado “Efeito do tratamento materno com sertralina e amitriptilina durante a gestação no comportamento e na fertilidade da prole adulta de camundongos Swiss”.

Como resultado das pesquisas realizadas com o Phtalox®, os artigos aqui expostos serão publicados. E parte da pesquisa será apresentada em setembro na “40ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológica (SBPqO).

Além disso, colaborei nos seguintes trabalhos que em breve serão publicados:

- “Desenvolvimento de snacks saudáveis enriquecidos com própolis orgânica microencapsulada: avaliação das propriedades biológicas, bioacessibilidade, transporte celular e ação prebiótica”, da doutoranda Ana Sofia Martelli Chaib Saliba.
- “Caracterização química e atividade antimicrobiana em modelos *in vitro* e *in vivo* de *Galleria mellonella* do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona marginata*”, do mestre Namuhell Oliveira da Silva.
- “Estudo químico e biológico de *Eugenia florida* (Myrtaceae)”, da mestranda Sabrina Maia Teixeira Souto.
- “Avaliação da atividade antioxidante e dos constituintes majoritários de extratos de *Lasiodiplodia sp.*, após otimização do meio de cultivo”, do mestrando Lucas Silva Tironi.
- “Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método do ágar em bloco de fungos endofíticos isolados do café (*Coffea arabica*)”, do graduando em biologia Guilherme dos Reis Carvalho.

E por fim, fui selecionada como “Jovem Embaixador 2023” da Sociedade Brasileira de Microbiologia, ganhando uma participação no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia, que este ano acontecerá em Foz do Iguaçu.

REFERÊNCIAS

ANJU, V.T. *et al.* Polymicrobial Infections and Biofilms: Clinical Significance and Eradication Strategies. **Antibiotics**, v. 11, p.1731, 2022.

ARAÚJO, A. R. L. *et al.* Azides and porphyrinoids: Synthetic approaches and applications. Part 2—Azides, phthalocyanines, subphthalocyanines and porphyrazines. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1745, 2020.

BENADUCCI, T. *et al.* Virulence of *Cryptococcus sp.* biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an alternative model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

BLOCH, S. *et al.* Nonulosonic acids contribute to the pathogenicity of the oral bacterium *Tannerella forsythia*. **Interface Focus**, v. 9, 2019.

BOMAN, H. G., HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review of Microbiology**, vol. 41, n. 1, p. 103, 1987.

DE OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.

DESAI, A. V. *et al.* Biology of Greater Wax moth, *Galleria mellonella* L. on artificial diet. **J. Exp. Zool. India**, v. 22, p. 1267-1272, 2019.

FIGUEIREDO, K. A. *et al.* Brazilian red propolis is as effective as amoxicillin in controlling red-complex of multispecies subgingival mature biofilm *in vitro*. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 432, 2020.

FIGUEIREDO, L. C. *et al.* Propolis, aloe vera, green tea, cranberry, calendula, myrrha and salvia properties against periodontal microorganisms. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2172, 2022.

HAQUE, M. M. *et al.* Advances in novel therapeutic approaches for periodontal diseases. **BMC Oral Health**, v. 22, 2022.

HERBERT, B. A.; NOVINCE, C. M.; KIRKWOOD, K. L. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 207-227, 2016.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 2018.

LOH, J. M. S. *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.

MARTÍNEZ, M. *et al.* The role of the oral microbiota related to periodontal diseases in anxiety, mood and trauma and stress-related disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 2021.

MÉNARD, G. *et al.* *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

MIRANDA, S. L. F. *et al.* Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 308–19, 2019.

MORI, S.; SHIBATA, N. Synthesis and application of trifluoroethoxy-substituted phthalocyanines and subphthalocyanines. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 2273–96, 2017.

NEAMTU, M *et al.* Iron phthalocyanine-sensitized magnetic catalysts for bpa photodegradation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5376, 2020.

ORCINA, B. F. *et al.* A phthalocyanine derivate mouthwash to gargling/rinsing as an option to reduce clinical symptoms of COVID-19: Case series. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 47–50, 2021.

PALKA, L.; NOWAKOWSKA-TOPOROWSKA, A.; DALEWSKI, B. Is chlorhexidine in dentistry an ally or a foe? A narrative review. **Healthcare**, v. 10, n. 5, p. 764, 2022.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions: classification and case definitions for periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S173–82, 2018.

PEREIRA, T. C. *et al.* Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 2018.

POLETI, M. L. *et al.* Use of mouthwash and dentifrice containing an antimicrobial phthalocyanine derivative for the reduction of clinical symptoms of COVID-19: a randomized triple-blind clinical trial. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 22, p. 101777, 2022.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; van WINKELHOFF A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. **Journal of Periodontology**, v. 85, p. 160–9, 2014.

SANTOS, C. *et al.* Virucidal activity of the antiseptic mouthwash and dental gel containing anionic phthalocyanine derivative: *In vitro* study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 269–74, 2021.

SANTOS, P. S. S. *et al.* Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: Randomised trial. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19937, 2021.

SCHMIDT, A. B.; CALVETE, M. J. F. Phthalocyanines: An old dog can still have new (photo)tricks! **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2823–2823, 2021.

SEDGHI, L. M.; BACINO, M.; KAPILA, Y. L. Periodontal disease: The good, the bad, and the unknown. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 7, 2021.

SEDGHI L. M. *et al.* The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. **Periodontol 2000**, v. 87, p.107-131, 2021.

SEKKAT N. *et al.* Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. **Molecules**, v. 23, p. 98-144, 2012.

SILVA, N. *et al.* Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015.

SMITH, D. F. Q.; CASADEVALL, A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. **Pathogens and Disease**, v. 79, 2021.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, n. 1, p. 135–87, 2005.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134–44, 1998.

STEFANO, M. *et al.* Impact of oral microbiome in periodontal health and periodontitis: A critical review on prevention and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5142, 2022.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

TSUCHIDA, S., NAKAYAMA, T. Metabolomics research in periodontal disease by mass spectrometry. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2864, 2022.

VILHENA, F. V. *et al.* Effectiveness of experimental whitening toothpastes containing colorants on the optical properties of enamel. **The Scientific World Journal**, v. 2022, p. 1–9, 2022.

WODJA, I. *et al.* The greater wax moth *Galleria mellonella*: Biology and use in immune studies. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 9, 2020.

XU, W. *et al.* Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 120, p. 45–84, 2020.

ZUPANČIČ, J., *et al.* Synergistic interactions in microbial biofilms facilitate the establishment of opportunistic pathogenic fungi in household dishwashers. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.