

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia
fotodinâmica sobre microrganismos
cariogênicos presentes na saliva de crianças**

Marco Aurélio Benini Paschoal

Bauru

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCO AURÉLIO BENINI PASCHOAL

Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre
microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças

BAURU
2009

MARCO AURÉLIO BENINI PASCHOAL

Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontopediatria
Orientadora: Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

BAURU
2009

P262a Paschoal, Marco Aurélio Benini
Avaliação *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre
microrganismos cariogênicos presentes na saliva de
crianças / Marco Aurélio Benini Paschoal. -- Bauru,
2009.

142p. : il ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total e/ou parcial da dissertação, por processos fotocopiadores ou outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº 032/2008
Data: 10 de setembro de 2008

DADOS CURRICULARES

Marco Aurélio Benini Paschoal

22 de dezembro de 1982
Araraquara-SP

Nascimento

Filiação

Carlos Alberto Paschoal
Cecília Regina Benini

2003-2006

Curso de graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo

2007-2009

Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, em nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

Associações

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

IADR – International Association for Dental Research

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha mãe, Cecília Regina,

Mãe, agradeço todos os dias por Deus ter colocado a senhora em meu caminho. Creio que coincidências não existam. Creio que as pessoas colocadas ao nosso redor sirvam para que possamos crescer e aprender com seus erros e acertos. Sua sapiência, força, garra, determinação e paciência são seus ensinamentos dos quais jamais esquecerei. Obrigado por ser este ser humano repleto de carinho, atenção e amor. Esta pessoa que, simplesmente, se dedica integralmente a seus filhos, anulando-se, muitas vezes, para que possa proporcionar algo melhor em nosso dia-a-dia. Nunca me esquecerei do dia em que saí de casa e você, olhando em meus olhos disse: *“Nunca se esqueça: em primeiro lugar, vá ser feliz, acredito em você e eu sempre estarei aqui não importa o que houver. Lute, lute sempre, porque o que jamais alguém irá lhe tirar é a educação e esse é o maior bem que posso lhe oferecer. Te amo sempre”*. Seu exemplo de vida me fez enxergar que a vida é muito curta para ser desperdiçada, que nossa existência deve ser vivida ao máximo e que os bens materiais passam e que nós todos iremos, um dia, para o mesmo lugar. Sendo assim, creio que, por meio da senhora, nunca desisti de meus sonhos e que sou, assim como você, essa pessoa fácil de lidar e conviver. Obrigado pelos bons e maus momentos. Obrigado por me fazer crer que nada é por acaso e que tudo que passamos deve ser olhado sempre pelo ângulo da experiência para que possamos nos tornar seres humanos melhores. Não sei o que fiz para ser tão amado e não sei se poderei um dia retribuir esse sentimento à mesma altura e na mesma magnitude, só sei que sem você ponho em dúvida se teria conquistado tudo o que tenho hoje.

Meu eterno agradecimento!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por me dar força e saúde para que eu pudesse levantar todos os dias e lutar pelos meus objetivos e ideais. Enquanto crer em Ti sei que jamais caminharei sozinho em minha jornada. Obrigado Senhor.

Ao meu pai Carlos Alberto, pela minha educação e por acreditar sempre em mim e meu potencial. Desejo que você seja muito feliz. Obrigado por tudo que me proporcionou.

À minha irmã Mariana, por fazer de meus dias sempre os melhores possíveis, por me fazer acreditar em superação e que podemos ser seres humanos melhores. Obrigado pela convivência e paciência até hoje. Desejo toda a felicidade do mundo ao seu núcleo familiar.

Ao meu avô Carlos e Clarice (Tata), que nunca mediram esforços para me ajudar em todos os sentidos. Obrigado por todos os seus ensinamentos e creiam que grande parcela de minhas conquistas é devida a vocês. Nas horas mais difíceis vocês sempre estavam lá, nos apoiando. Sou eternamente grato a vocês.

Aos meus tios, tias e primos, que sempre estiveram torcendo por mim em todos os momentos e que olharam pela minha família enquanto estive fora de meu lar. Agradeço sempre pelo apoio e pelos conselhos.

À vocês, meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Minha estada fora de meu lar só pode ser agradável e igualmente recompensadora por essas pessoas, segunda família para mim, serem tão especiais. A vocês, agradeço:

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, minha mentora e orientadora. Agradeço todas as oportunidades oferecidas, pela confiança e companheirismo. Conviver com alguém como a senhora me fez acreditar no *“para que pensar pequeno se podemos pensar grande”*. Sempre disposta a ajudar e fazer com que em seus orientados surja o sentimento investigativo e ao mesmo tempo, cientista de ser. “Cidinha”, obrigado em primeiro lugar por ser essa mestra e cientista que simplesmente não pára. Creio que falem pessoas assim, que lutem, que vibrem com pequenas coisas, que esmiuquem, que queiram fazer diferença no mundo. Agradeço ao Senhor por colocá-la em meu caminho, pois creio que, meu crescimento, tanto científico quanto pessoal, é devido em grande parte à senhora. Obrigado pelos seus ensinamentos e pela convivência. Sou eternamente grato por fazer parte de minha vida!

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, agradeço pela confiança desde os primeiros anos de minha graduação. O dom para ensinar é para poucos e o senhor mostrou o quanto pode ser prazerosa esta tarefa. Cientista ímpar, o senhor marcou minha vida acadêmica com seu exemplo de dedicação à ciência e a seus alunos. Sempre em minhas épocas de dúvidas e questionamentos o senhor esteve sempre presente. Agradeço por sempre me ajudar sem nunca questionar; pelos seus ensinamentos e pelo seu exemplo de vida. Obrigado professor, por tudo.

À Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva, coordenadora do curso de mestrado em Odontopediatria. Professora de extrema excelência e conhecimento clínico. Agradeço à senhora pelos ensinamentos práticos, pela paciência em ensinar como ser um bom odontopediatra. Creio que nossa convivência foi lapidada com o tempo e que entendo e agradeço os motivos de sua exigência quanto à tudo. Obrigado por todas as lições, pois só assim sou o cirurgião-dentista odontopediatra que sou hoje.

À Profa. Dra. Daniela Rios, por sempre estar disposta a dividir seu conhecimento e experiência. Sua garra, disposição, determinação e educação sempre serão para mim um exemplo. Obrigado pelos ensinamentos e por sempre confiar em meu trabalho. Creio que pelo pouco que convivemos, academicamente, você pode não acreditar, mas foi de extrema valia para mim. Aprendi com você que seriedade e competência são requisitos básicos para um cientista e que o respeito, acima de tudo, faz parte das relações interpessoais. Por isso, convivi com você aprendendo e aprendi convivendo; isso para mim foi prazeroso, pois ensinou como a ciência pode ser transmitida de um modo menos maçante. “Dani” meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo e Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, por serem exemplos vivos de que de nada vale o conhecimento sem experiência. Estes exemplos de professores me fizeram ver que a Odontologia é uma ciência maravilhosa e que para ser um bom cirurgião-dentista é necessário preparo e paciência e que isso tudo é conseguido às custas de muito estudo e trabalho árduo.

À profa. Dra. Thaís Marchini, pessoa altamente competente e humilde. Sempre disposta a ajudar e atenciosa. Obrigado pelo seu exemplo de vida e determinação. Seja muito feliz.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Microbiologia, representado pela **Profa. Dra. Ana Paula Campanelli**. Agradeço por facilitar a execução deste trabalho e por conceder materiais e pessoal extremamente qualificado para esta tarefa. Obrigado por sempre estar disponível para quaisquer dúvidas e por ser esta profissional, a qual tenho grande admiração. No pouco tempo que tive para executar o estudo, pude perceber o quanto a ciência é maravilhosa e que pode ser revertida para a população. Agradeço por todos os alunos que prontamente se disponibilizaram para me ajudar: **Carla Sipert**, exemplo de dedicação, seriedade e, ao mesmo tempo, humana e racional, sempre disposta a ensinar e solucionar diversos problemas; **Thaís Gasparotto** que, mesmo me conhecendo muito pouco, foi de extrema importância para este trabalho transmitindo-me conhecimento, ensinando metodologias e sempre prestativa. Aos alunos **Hayana, Erivam, Ana Carolina e Tatiana** que fizeram de meu cotidiano no laboratório um pouco menos estressante, altamente produtivo e divertido.

Ao **André da Silva**, técnico do laboratório de Microbiologia. Pessoa extremamente competente e sempre disposta a ajudar. Seu auxílio foi de extrema importância para o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigado.

À **Márcia Graeff**, responsável pelo Microscópio Confocal a Laser do CIP – I. Agradeço pela obtenção das imagens, pela disponibilidade de tempo e simpatia. Muito obrigado.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, **Fátima, Lílian, D. Lia, Estela e Márcia**. Agradeço pelo respeito, dedicação e companheirismo. Trabalhar com vocês foi um prazer e, como já disse uma vez, nosso trabalho sem vocês iria se tornar árduo e desgastante. Muito obrigado.

Aos Doutorandos Thiago e Agnes, os quais foram meus grandes conselheiros.

Agradeço sempre pela disponibilidade, por me receberem em sua casa a qualquer horário e por sempre estarem dispostos a me escutar. Profissionais maravilhosos e competentes, sei que serão muito bem sucedidos. Foi um prazer a convivência com vocês e agradeço sempre a Deus por os colocarem em meu caminho. Serei eternamente grato a vocês.

À minha turma de Mestrado, formada por **Adriana, Carla, Cristiane, Júnia, Natalino e Tatiana**. Nós, nesses dois anos de convivência, pudemos mostrar que um grupo altamente heterogêneo pode conviver muito bem. Cada um com sua experiência pessoal e profissional pôde acrescentar à minha vida grandes ensinamentos. Agradeço por sempre me ajudarem e serem companheiros. Crescemos academicamente juntos, erramos e acertamos e creio que, na medida do possível, fizemos um bom trabalho. Desejo toda a felicidade do mundo a vocês e à suas famílias.

Aos colegas de outras turmas, **Marcelo** (Estomatologia), **Thaís** (Ortodontia), **Camila** (Ortodontia), **Michele** (Ortodontia), **Éllen** (Estomatologia), **Mariana** (Ortodontia), **Núria** (Ortodontia), **Bel** (Biologia Oral), **Leslie** (Dentística), **Luciana** (Dentística), **Cadú** (Biologia Oral), **Angélica** (Dentística), **Marcela** (Dentística), **Aline** (Reabilitação Oral), **Priscila** (Reabilitação Oral), Janine (Ortodontia), Mayara (Ortodontia) e Rachele (Ortodontia) por tornar a convivência durante o curso de Mestrado muito mais agradável. Muito obrigado.

Aos amigos de Araraquara, Paulo, Ana Carolina e Mariana sempre presentes nos momentos bons e ruins da vida. Obrigado pela paciência e convivência.

Aos funcionários da **FOB-USP**, que, com respeito e responsabilidade, de uma forma ou outra ajudaram-me para que eu alcançasse mais esse degrau. Muito obrigado.

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Odontologia de Bauru, representadas pelas pela Reitora Profa. Dra. Suelly Villela e pelo Diretor da FOB-USP, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro por oferecer estudo de qualidade e contribuir para a formação de ótimos profissionais. Sem o acolhimento e ajuda desta Instituição a concretização desse sonho seria inviável.

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao Centro de Óptica e Fotônica de São Carlos, pela concessão do equipamento “*Bio Table*” e pela parceria indispensável para a concretização deste trabalho.

Ao auxílio **PROAP**, pela concessão de insumos e equipamentos para a realização do estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPQ**) pela bolsa de estudos concedida, sem a qual seria impossível concluir o curso de Mestrado.

“A paciência é amarga, mas seus frutos são doces”

(Kant)

RESUMO

RESUMO

O surgimento de resistência bacteriana aos tratamentos convencionais tem proporcionado o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento e/ou controle da cárie dentária. Nesse contexto, a utilização da terapia fotodinâmica (TFD) é sugerida como alternativa para a inativação de microrganismos patogênicos envolvidos na gênese da cárie. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica (TFD) sobre três culturas de *S. mutans*: uma cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e dois isolados clínicos (43513 e 47513) oriundos da saliva de crianças. O corante (C) azul de orto-toluidina (TBO) foi utilizado associado à iluminação com LED's (L) no comprimento de onda vermelho. Estas suspensões foram transferidas para placas de 96 orifícios, tratadas com quatro concentrações de TBO (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) e expostas a quatro dosimetrias (12; 24; 36 e 48 J/cm²) constituindo o grupo C+L+ (TFD). Suspensões adicionais foram tratadas somente com as quatro concentrações de TBO (C+L-) ou apenas com as quatro dosimetrias (C-L+). Amostras não submetidas ao tratamento com a fonte de luz nem ao corante, constituíram a condição C-L- (controle positivo). Alíquotas de 100 µL de cada orifício foram transferidas para tubos de ensaio para se verificar a presença ou ausência de crescimento microbiológico. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL do grupo correspondente a TFD (C+L+) foram semeadas em placas de Petri, as quais foram incubadas a 37⁰C por 48 horas para posterior visualização de halos de inibição e/ou crescimento microbiológico correspondente a efetividade ou ineficiência da TFD, respectivamente. Com o intuito de confirmar os achados, essas mesmas amostras foram submetidas à análise pela microscopia confocal a laser. Os resultados demonstraram que a TFD, em determinadas condições experimentais, foi efetiva no controle do crescimento microbiológico das espécies de *S. mutans* usadas neste estudo. A concentração mínima de TBO necessária para a inativação *in vitro* das três culturas de *S. mutans* foi de 2,5 µg/mL associada à dosimetria mínima de 24 J/cm² da fonte de luz LED utilizada no estudo.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Streptococcus mutans*. Bactéria.

ABSTRACT

ABSTRACT

***In vitro* evaluation of the photodynamic therapy effects on the cariogenic microorganisms in saliva of infants**

The increase of bacteria's resistance to conventional treatment resulted in the development of new therapeutic modalities for dental caries treatment and/or prevention. In this field, the use of photodynamic therapy (PDT) is suggested as an alternative for inactivation of pathogenic microorganisms involved in the etiology of tooth decay. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of the photodynamic therapy (PDT) on bacteria suspensions of *S. mutans* (ATCC 25175) and two suspensions (43513 and 47513) from infants saliva. Toluidine blue O (TBO) (D) and a red light-emitting diodes (LED's) (L) were used in association. Samples were inserted into 96 well-plate and treated with four TBO concentrations (0.25; 2.5; 25 e 250 µg/mL) and exposed to four dosimetries (12; 24; 36 e 48 J/cm²) defining the D+L+ group (PDT). Additional samples were treated only with TBO (D+L-) or only with red LED's (D-L+). The treatment without dye and none red LED constituted the D-L- condition (positive control). Aliquots from D+L+ (TFD group) were inserted in Petri dishes, which were incubated at 37⁰C for 48 hours. Posterior analysis of microbiologic growth, corresponding to PDT effectivity, was conducted. These samples were also submitted to laser confocal microscopy analysis for microbiologic data confirmation. The results showed PDT effectiveness for *S. mutans* inactivation in particular conditions. It was demonstrated that PDT was efficient to kill *S. mutans* species in the presence of the TBO at 2.5 µg/mL (minimum concentration) associated to 24 J/cm² dosimetry.

Key-words: Photodynamic therapy. *Streptococcus mutans*. Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Corante azul de orto-toluidina (TBO).....	82
Figura 2 - Dispositivo utilizado no estudo como fonte de luz denominado “ <i>Bio Table</i> ”.....	84
Figura 3 - Característica de viabilidade bacteriana (cor verde) à microscopia confocal a laser.....	90
Figura 4 - Característica de morte bacteriana (cor vermelha) à microscopia confocal a laser.....	91
Figura 5 (A) - Crescimento de <i>S. mutans</i> ATCC (25175) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	96
Figura 5 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>S. mutans</i> ATCC (25175) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	96
Figura 6 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana de <i>S. mutans</i> ATCC (25175) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	97
Figura 6 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para a cepa padrão de <i>S. mutans</i> ATCC (25175) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	97
Figura 7 (A) - Crescimento do isolado clínico de <i>S. mutans</i> (43513) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	100
Figura 7 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) do isolado clínico <i>S. mutans</i> (43513) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	100

Figura 8 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana de <i>S. mutans</i> (43513) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	101
Figura 8 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para o isolado de <i>S. mutans</i> (43513) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	101
Figura 9 (A) - Crescimento do isolado clínico de <i>S. mutans</i> (47513) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	104
Figura 9 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) do isolado clínico <i>S. mutans</i> (47513) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	104
Figura 10 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana de <i>S. mutans</i> (47513) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz).....	105
Figura 10 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para o isolado de <i>S. mutans</i> (47513) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz).....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições experimentais avaliadas para cada microrganismo exposto a terapia fotodinâmica.....	139
Tabela 2 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).....	95
Tabela 3 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de <i>S. mutans</i> (43513).....	99
Tabela 4 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de <i>S. mutans</i> (47513).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

TBO	azul de orto-toluidina
J/cm ²	Joule por centímetro cuadrado
µg/mL	microgramas por mililitro
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
LED	diodo emissor de luz
FS	agente fotossensibilizador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	45
2	REVISÃO DE LITERATURA	51
2.1	CÁRIE DENTÁRIA.....	51
2.2	BIOFILME DENTÁRIO.....	52
2.3	ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS INFECTIVIDADE.....	54
2.4	MEDIDAS PREVENTIVAS NO CONTROLE BACTERIANO.....	56
2.5	MEDIDAS PREVENTIVAS NO CONTROLE BACTERIANO.....	56
2.6	AÇÃO ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	59
2.6.1	Estudo da terapia fotodinâmica (TFD) em bactérias bucais	60
3	PROPOSIÇÃO	75
4	MATERIAIS E MÉTODOS	79
4.1	MATERIAIS.....	79
4.1.1	Amostras microbiológicas utilizadas	79
4.1.2	Materiais de consumo	79
4.1.3	Instrumentos	80
4.1.4	Equipamentos	80
4.2	MÉTODOS.....	81
4.2.1	Preparo dos materiais microbiológicos	81
4.2.2	Procedimento de terapia fotodinâmica (TFD)	82
4.2.3	Amostras utilizadas no estudo	84
4.2.4	Situações experimentais estudadas	85
4.2.5	Análise dos achados	88
5	RESULTADOS	95
5.1	AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>S. MUTANS</i> (ATCC 25175).....	95
5.2	AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>S. MUTANS</i> (43513) E <i>S. MUTANS</i> (47513).....	98
6	DISCUSSÃO	109
6.1	ASPECTOS INERENTES AO MÉTODO EMPREGADO.....	109
6.2	ASPECTOS INERENTES AOS RESULTADOS ALCANÇADOS.....	114
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	125
	APÊNDICES	137
	ANEXO	141

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por uma complexa, específica e altamente inter-relacionada rede de microrganismos, incluindo espécies aeróbias e anaeróbias de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Enquanto a grande maioria destes microrganismos convivem em equilíbrio, alguns fatores podem mudar este quadro levando à ocorrência de doenças causadas pela predominância de determinadas colônias de microrganismos identificados como agentes etiológicos de uma variedade de doenças bucais (KONONEN, 2000; HENDERSON, 1998; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1998).

Muitas dessas espécies microbianas estão organizadas na forma de biofilmes que são formados sobre a superfície dentária. O acúmulo desse biofilme dentário resulta na mais prevalente doença bucal bacteriana do homem, a cárie dentária (NEWMAN; WILSON, 1999).

O acúmulo do biofilme dentário é um dos fatores envolvidos na gênese da cárie sendo que os microrganismos considerados agentes etiológicos, são principalmente: os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, lactobacilos e *Actynomices viscosus*. Desta forma, a prevenção desta doença está baseada no controle desse biofilme que se acumula na superfície do dente de modo que a “ecologia da microbiota bucal” seja mantida. (PAULINO; RIBEIRO; THEDEI et al., 2005).

Métodos tradicionais para o tratamento da doença são o controle mecânico e químico. O mecânico envolve a remoção do tecido cariado com brocas e/ou instrumentos manuais. No entanto, esta abordagem, na realidade, não foca a cura, mas sim o reparo do dano causado pela cárie. Sendo assim, com o reconhecimento de que esta doença está associada a microrganismos específicos, houve um crescente interesse em associar agentes antimicrobianos como a clorexidina a dentifrícios e enxaguatórios bucais e, assim, atuar conjuntamente com a remoção mecânica do biofilme dentário, constituindo o controle químico da cárie dentária (QUIRYNEN; TEUGHELDS; DE SOETE et al., 2002; JORGENSEN; SLOTS, 2000; CAUFIELD; DASANAYAKE, 2001; LOPEZ; BERKOWITZ; SPIEKERMAN et al., 2002). Neste tipo de

abordagem química de prevenção e/ou tratamento, uma das grandes preocupações é que a aplicação tópica desses agentes químicos possa gerar problemas de resistência bacteriana, além de causar efeitos colaterais indesejáveis pelo seu uso prolongado (COURVALIN, 1996; MALIK; LADAN; LITZAN, 1992). Como a etiologia da cárie dentária é multifatorial, esses métodos de controle não eliminam por completo os microrganismos.

Com o intuito de encontrar outras formas de realizar o controle bacteriano, pesquisas são realizadas em diferentes segmentos da ciência. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) surgiu como uma alternativa para o tratamento e prevenção da cárie dentária (NAUTA; VANLEENGOED; STAR et al., 1996).

O princípio da TFD baseia-se na utilização de fotossensibilizadores (FS) ou corantes que irradiados com uma fonte de luz (laser ou diodos emissores de luz – LED's) de comprimento de onda específico, são ativados, levando a produção de espécies de oxigênio altamente reativo (oxigênio singleto), as quais as células utilizam para seu metabolismo, levando à morte bacteriana. A luz e a droga sozinhas são compostos não-tóxicos e somente as bactérias que contém esses compostos são afetadas pelo tratamento. Como a interação do oxigênio altamente reativo com as moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a TFD. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência bacteriana, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular (CARRÉ; JAYAT; GRANET et al., 1999). Além disso, o procedimento pode ser repetido várias vezes, uma vez que não há efeitos tóxicos cumulativos e é, usualmente, não invasivo.

Microrganismos tais como fungos, leveduras e vírus também podem ser mortos pelo tratamento com um FS ou corante apropriado e luz, denominados por alguns autores por inativação fotodinâmica ("Photodynamic Inactivation") (GAD; ZAHRA; HASAN et al., 2004).

Há mais de 100 anos, Raab (1900) publicou o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (eosina e alanranjado de acridina) sobre microrganismos. A aplicabilidade dessa técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra Mundial, mas

foi abandonada, devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina. O retorno da aplicação antimicrobiana da TFD na última década é resultado do crescimento das infecções hospitalares devido à resistência bacteriana aos fármacos (WAINWRIGHT, 2002).

Estudos específicos, utilizando diferentes fontes de luz e corantes e FS apontam para a inativação eficiente de espécies de microrganismos bucais, incluindo *S. mutans*, *S. sobrinus* (WILSON; DOBSON; SARKAR, 1993; SOUKOS; WILSON; BURNS et al., 1996; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; BEVILACQUA; NICOLAU; KHOURI et al., 2007; BURNS; WILSON; PEARSON, 1995); *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e espiroquetas (LOESCHE; GROSSMAN, 2001; SUCHETT-KAYE; MORRIER; BARSOTTI, 2001; ROVALDI; PIEVSKY; SOLEN et al., 2000); *S. salivarius*, *S. faecalis*, *S. aureus* e *B. subtilis* (DAHL; MIDDEN; NECKERS, 1988).

Os FS e corantes estudados para atuar na eliminação dos microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos, como os xantenos halogenados (rosa de bengala), os fenotiazínicos (azul de toluidina e azul de metileno), as acridinas, os conjugados de clorina (e6), os derivados meriocianínicos e os derivados de hematoporfirinas (WAINWRIGHT, 2002; SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999).

O foco das pesquisas *in vitro* que envolvem a TFD visam à eliminação e/ou controle dos microrganismos causadores da cárie dentária. Nesses estudos, há a utilização de diferentes fontes de luz (lasers de baixa potência e os diodos emissores de luz – LED's), diferentes espécies de microrganismos, incluindo aqueles oriundos do biofilme dentário, saliva, culturas já isoladas e diversos FS e corantes em concentrações variadas (MACHADO, 2000; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Não há ainda um consenso em relação aos parâmetros a serem empregados em pesquisas envolvendo a TFD sobre microrganismos cariogênicos em suspensões bacterianas, incluindo-se a dosimetria, tipos de luz e concentração dos corantes e/ou FS. Dessa forma, justifica-se a realização de estudos complementares para o esclarecimento desses aspectos. Sendo assim, torna-se de fundamental importância o desenvolvimento de estudos *in*

vitro que visem uma melhor definição desses parâmetros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é um processo multifatorial de caráter bacteriano associado à dieta alimentar e continua sendo um processo infeccioso com elevado índice de incidência em seres humanos. Este quadro ainda se configura nos dias atuais a despeito do volume de pesquisas científicas dedicadas a este assunto e aos inúmeros produtos lançados no mercado com a finalidade de reduzir sua incidência (BOWEN, 2002).

O processo de desenvolvimento da cárie dentária tem sido intensivamente estudado (HAMADA; SLADE, 1980; LOESHE, 1986; BOWEN, 2002), sendo caracterizado primariamente como uma desmineralização do tecido dentário mais externo provocada por ácidos, em especial o láctico, produzido por meio da fermentação de carboidratos por microorganismos presentes no biofilme dentário (MARSH, 1999).

O desenvolvimento da cárie depende da interação de alguns fatores, tais como: a resistência imunológica do hospedeiro, anatomia dos dentes, a microbiota constituinte do biofilme dentário e a dieta alimentar, modelo este proposto por Keyes (1962). Em 1988 foi sugerida a inclusão de um quarto fator, o tempo, considerando que o processo de desmineralização (DES) não é instantâneo (NEWBRUN et al., 1988). Esses quatro fatores são denominados fatores essenciais à formação das lesões de cárie ou fatores primários. Os fatores secundários estão relacionados, principalmente, com as características da saliva, destacando-se a velocidade do fluxo e seus componentes (KRASSE, 1988).

A cárie dentária representa um significativo problema de saúde e de economia pública e individual na maioria dos países, pois é a doença infecciosa crônica de maior incidência na espécie humana (CHAVES, 1986). Mesmo nas muitas nações que conseguiram apreciável controle dessa doença

em crianças e jovens, a cárie continua a ser um sério problema de saúde (CHAVES, 1986).

A incidência da cárie dentária em todas as faixas etárias atingiu seu mais significativo índice no século passado, a ponto de preocupar entidades internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Federação Internacional (FDI) (CHAVES, 1986).

A partir de 1969 (PEREIRA, 2003) a OMS reuniu dados oriundos de levantamentos epidemiológicos efetuados nos diversos países e periodicamente os tem publicado, dando especial atenção ao índice CPOD (somatória de dentes Cariados, Perdidos e Obturados) em crianças com 12 anos de idade, que passou a ser importante referencial de saúde ou patologia dentária. A verificação dos índices iniciais apresentados pelos habitantes principalmente das zonas urbanas, mesmo de nações industrializadas e já altamente evoluídas, eram simplesmente alarmantes. Sendo assim, a OMS e a FDI, em 1982, procuraram incentivar a adoção de medidas preventivas ou pelo menos controladoras.

De acordo com o banco de dados da OMS, o Brasil manteve-se, desde os primeiros dados de 1969 até meados da década de 1990, alinhado entre os países cuja população, inclusive crianças com 12 anos, apresentava a mais alta prevalência de cárie e de dentes extraídos constatadas em todo o mundo. O conjunto dessas observações, de forma insofismável, corrobora o conceito segundo o qual apenas a utilização do clássico paradigma cirúrgico-reparador tem-se mostrado insuficiente para refrear as causas e os efeitos dessa doença (PEREIRA, 2003).

2.2 BIOFILME DENTÁRIO

Dentre os fatores primários citados, o biofilme dentário é considerado o principal fator etiológico para o desenvolvimento de cáries e doenças periodontais. Trata-se de uma película incolor, aderente e não mineralizada,

composta por diversas espécies bacterianas, sustentadas por uma matriz de proteínas salivares, polissacarídeos, células descamadas, leucócitos e restos alimentares, que se forma sobre a superfície dos dentes e tecidos gengivais em diferentes regiões da cavidade bucal (MARSH; BRADSHAW, 1997).

A análise química de amostras de biofilme dentário recolhidas de seres humanos e animais revelou que aproximadamente 20% de sua massa seca é composta por carboidratos (HOTZ, 1972; BOWEN et al., 1977). As células bacterianas podem constituir 60 a 70% da massa do biofilme, o qual pode conter de 10^6 a 10^{11} microorganismos por grama (RAMBERG et al., 2003).

O processo de adesão e/ou adsorção química específica de certas espécies bacterianas presentes na cavidade bucal à película adquirida ou película salivar que reveste a superfície dos dentes é a primeira etapa de formação do biofilme. A colonização dos dentes ocorre em duas fases distintas e, aparentemente, independentes (GIBBONS; NYGAARD, 1968). O início da colonização ocorre através de interações específicas de proteínas, especialmente glicoproteínas salivares, de película adquirida do esmalte, que funcionam como receptores para proteínas presentes na parede celular bacteriana, as adesinas. Esta primeira etapa é reversível. O passo seguinte está relacionado ao acúmulo de *S. mutans* através de seu crescimento e produção de glucanas extracelulares, envolvendo diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microorganismos bucais (KOLENBRANDER; LONDON, 1993).

O biofilme garante a vida da colônia bacteriana em ambientes instáveis, por proporcionar uma série de vantagens, tais como melhor comunicação entre as células por estabelecer continuidade entre elas, facilitação das reações bioquímicas, melhor proliferação e acesso a recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, além da defesa coletiva contra fatores antagônicos. Mas ao contrário do que se possa supor, a colonização microbiana dos dentes pode ser benéfica, na medida em que contribui para a defesa da cavidade bucal contra a instalação de microrganismos patogênicos, por meio de mecanismos de competição. A microbiota residente no biofilme dentário é uma comunidade relativamente estável com alta diversidade de espécies que podem variar de um lugar para o outro, coexistindo através de

interações metabólicas altamente relacionadas (VAN DER HOEVEN; CAMP, 1994; SMITH; PIPPIN, 1998). Todavia, para permanecerem na cavidade bucal, as espécies bacterianas devem estar aptas a tolerar flutuações bruscas e substanciais do meio em que vivem, sobretudo no que diz respeito ao pH e aos nutrientes disponíveis (LEMOS et al., 2005).

Os biofilmes dentários são formados quando microorganismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, podendo haver a formação de biofilmes a partir de uma ou múltiplas espécies bacterianas (MAH; O'TOOLE, 2001; SPRATT; PRATTEN, 2003).

No biofilme existe um equilíbrio dinâmico. A lesão de cárie ocorre quando o equilíbrio do processo físico-químico, de desmineralização-rem mineralização (DES/RE), é quebrado, ou seja, quando a composição e as atividades metabólicas desta complexa comunidade que o compõem são modificadas (BURNE, 1998). Assim, no processo dinâmico de formação do biofilme dentário potencialmente cariogênico, uma comunidade microbiana, composta por um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros microrganismos oportunistas.

As bactérias metabolicamente ativas que colonizam o biofilme dentário, consumindo carboidratos fermentáveis, causam variações no pH do meio, que podem culminar com a desmineralização (DES) do esmalte dentário, e assim, as lesões de cárie resultam da interação entre as bactérias fermentadoras de carboidratos que colonizam a superfície dos dentes com os constituintes da dieta alimentar, sobretudo a sacarose. Portanto, o desenvolvimento do biofilme dentário é a primeira evidência clínica desta interação (VACCA-SMITH et al., 1996; MANJI et al., 1991).

2.3 ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS E INFECTIVIDADE

A literatura evidencia dados consistentes de que o estreptococos do grupo mutans, de bactérias gram-positivas, são os microrganismos específicos sempre presentes no biofilme dentário potencialmente cariogênico, desempenhando papel-chave na patogênese da cárie em humanos (LOESHE, 1986; LI; BURNE, 2001).

Segundo Samaranayke et al. (1996), as evidências do papel *Streptococcus mutans* com a cárie dentária incluem algumas características, tais como: a existência de correlação entre contagem de *S. mutans* na saliva e no biofilme bacteriano com a prevalência e a incidência da cárie, o isolamento freqüente de *S. mutans* de superfícies dentárias antes do início das lesões de cárie, produção de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose pela maioria das cepas isoladas, e que podem atuar como reserva de carboidratos para suprir o metabolismo bacteriano, metabolização rápida de açúcares produzindo ácido lático e outros ácidos orgânicos, habilidade de atingir valores de pH considerados críticos para a DES do esmalte, mais rapidamente que outras bactérias do biofilme dentário e a habilidade em manter o crescimento e continuar a produzir ácidos em baixos valores de pH.

O período de aquisição dos estreptococos do grupo mutans é um dos fatores chave para melhor entendimento da evolução e do desenvolvimento do processo da cárie, pois quanto mais precocemente a cavidade bucal da criança for colonizada por este microrganismo, maior a probabilidade de desenvolvimento da doença (KOHLEK; BRATHALL, 1978; ALALUUSA; RENKONEN, 1983).

Nos primeiros anos de vida, os estreptococos do grupo mutans podem ser ou não detectados ou estar provisoriamente presentes na boca das crianças em idade precoce (CARLSSON et al., 1970; BERKOWITZ; JORDAN; WHITE, 1975; MASUDA et al., 1979; ALALUUSUA; RENKONEN, 1983; FUJIWARA et al., 1991). Inicialmente, as crianças abrigam baixos níveis de *S. mutans* no biofilme dentário e a colonização é transitória (MASUDA et al., 1979; DAVEY; ROGERS, 1984; ALALUUSUA, 1996). Há vários relatos demonstrando que o

número de crianças infectadas com *S. mutans* aumenta com a idade (BERKOWITZ; TURNER; GREEN, 1981; BRETZ et al., 2003; CATALANOTTO; SHKLAIR; KEENE, 1975; KOHLER; BRATTALL; KRASSE, 1983; THORILD; LINDAU-JONSON; TWETMAN, 2002) face ao aumento da exposição a novas fontes de infecção e mudanças nas condições bucais, tais como, aumento do número de áreas retentivas e mudanças nos hábitos alimentares (aumento do consumo de sacarose).

Dessa forma, considerando-se que a cárie dentária é um processo infeccioso com elevado índice de incidência em seres humanos, justifica-se o uso de terapias para diminuir ou eliminar os microrganismos responsáveis pela progressão da doença.

2.5 MEDIDAS PREVENTIVAS NO CONTROLE BACTERIANO

Tendo em vista que a dieta humana na sociedade moderna é constituída, freqüentemente, por altas proporções de carboidratos fermentáveis, os métodos para prevenção e controle da cárie dentária estão orientados, seja diretamente ou indiretamente, à modificação da atividade do biofilme dentário para estados compatíveis com saúde. Partindo-se deste conhecimento prévio, o estabelecimento de medidas que se interponham a qualquer uma das propriedades fisiológicas de bactérias potencialmente cariogênicas podem resultar na prevenção da cárie dentária (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A prevenção e o controle na formação do biofilme bacteriano é a medida mais importante para se manter a saúde gengival e a dentária. Estudos realizados por Axelsson, Lindhe e Wäsebi (1976) demonstraram que a escovação e o uso do fio dental para remoção mecânica do biofilme é um meio seguro e eficaz, quando realizados regularmente. Porém, muitos trabalhos têm mostrado dificuldade de reduzir o *S. mutans* de fissuras e das superfícies proximais dos dentes apenas com o uso desses mecanismos, desta forma o

uso de agentes químicos como coadjuvantes da higienização bucal podem ser necessários para o controle eficaz do biofilme, agindo de diferentes formas. Os agentes químicos agem interferindo na adesão bacteriana à superfície do dente, prevenindo a proliferação microbiana e removendo o biofilme pré-existente, ou ainda, alterando a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis que é um mecanismo particularmente importante na aderência bacteriana (RIBEIRO; BUSSADOR, 2000).

O anti-séptico considerado ideal é aquele que apresenta alta substantividade, ou seja, persistência de ação, manutenção da atividade antimicrobiana, especificidade e ausência de efeitos colaterais. Os agentes anti-sépticos incluem os grupos de antibióticos, enzimas, bisbiguanidas, compostos de amônio quaternários, fenóis e óleos essenciais, sais de metais, agentes oxidantes, e produtos naturais (MORETTI, 2004). Dentre os agentes microbianos sintéticos utilizados temos: compostos fenólicos como o timol e o triclosan, que agem alterando a permeabilidade celular, levando a morte dos microorganismos e desnaturação protéica e os compostos catiônicos, dentre eles o cloreto de cetilperidíneo, além da clorexidina, que interferem na adesão bacteriana e provocam o rompimento da parede e membrana celulares bacterianas (SIMIONATO; IMPARATO; ODA, 2005).

O agente antimicrobiano mais eficaz usado no controle da cárie dentária é a clorexidina, uma bisbiguanida catiônica. A clorexidina é um composto químico, sintetizado em laboratório desde 1954, que apresenta uma molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (ALMEIDA; BASTOS, 2001).

A apresentação na forma de bochecho é aceita tanto pela Foods and Drug Administration (FDA) como pela American Dental Association (ADA) para a redução da inflamação gengival, sendo este o enxaguatório antibacteriano mais estudado (CARRANZA; NEWMAN, 1997).

Está bem demonstrado que a clorexidina inibe a formação de biofilme dentário quando aplicada duas vezes ao dia sob a forma de bochecho em uma concentração de 0,2%. Foi comprovado que ela reduz a incidência de cáries em animais e humanos e apresenta amplo espectro antimicrobiano (ROSA;

ROCHA, 1993; MATHIJS; ADRIAEMS, 2002; SEKINO et al., 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005), com efeito pronunciado sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e alguns vírus (SEKINO; RAMBERG; UZEL et al., 2004). É também capaz de inibir, por algumas horas após aplicação a formação de ácidos no biofilme já estabelecido. Poucos agentes antimicrobianos possuem um efeito semelhante no biofilme dentário. Tudo indica que a característica especial que lhe permite ser tão eficiente é a capacidade que esse composto possui de se reter na cavidade bucal por muitas horas após o bochecho. A clorexidina ainda tem alta afinidade pela hidroxiapatita, de modo que foi sugerido que este mecanismo de combinação poderia explicar os seus efeitos clínicos prolongados, além do que a mucosa oral é a região do organismo humano de maior retenção da droga, e a sua lenta liberação, mais do que a absorção inicial, é o fator essencial para seu efeito prolongado (TWETMAN, 2004). Em concentrações relativamente altas, poderá controlar o metabolismo das bactérias remanescentes. No espaço de tempo entre os bochechos, o forte efeito inicial bactericida parece converter-se numa ação bacteriostática, inibindo a formação de ácidos no biofilme por algumas horas após este. Além disso, a cada aplicação subsequente de clorexidina o nível de *S. mutans* reduz significativamente (PIOVANO; MARCANTONIO; DONO et al. 2005). Porém, apesar de eficiente no combate à cárie dentária, apresenta efeitos adversos, causando o aparecimento de manchas marrons na superfície dentária, além de proporcionar gosto metálico na boca, provocar náuseas e vômitos, dores abdominais, hipersalivação, dessensibilização das papilas gustativas e conseqüente perda do paladar (HILDEBRANDT, 1992).

Embora as indústrias farmacêuticas e químicas tenham produzido nas últimas décadas uma variedade de agentes anti-sépticos e antibióticos de forma a complementar a terapia mecânica de controle do biofilme dentário cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência bacteriana (seleção de espécies resistentes) a essas drogas usadas para fins terapêuticos (WILSON; BURNS; PRATTEN, 1996). Nesse sentido, a terapia fotodinâmica surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos

tradicionais na prevenção da cárie dentária (WILSON; BURNS; PRATTEN, 1996; GAD et al., 2004; ZEINA et al., 2002).

2.6 AÇÃO ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA

O descobrimento do antibiótico trouxe uma grande contribuição para o controle das patologias mediadas por bactérias, pois durante décadas foram efetivos no tratamento de muitas doenças. Contudo, com o passar do tempo, devido a excessiva prescrição desses medicamentos, a sua difundida adição a alimentos e outros agentes, a freqüente transmissão de microorganismos face à expansão da pobreza entre as populações nos países do terceiro mundo, assim como a grande variedade de mecanismos adotados pelas células no sentido de aumentar sua resistência aos desafios externos, houve um crescente aumento da resistência dos microorganismos a este tipo de medicamento. Sendo assim, atualmente muitos dos agentes antibióticos prescritos com freqüência não apresentam grande efetividade (MAISCH et al., 2005) e isto tem preocupado profissionais e pesquisadores da área de saúde.

É evidente que houve a necessidade do desenvolvimento de novas e eficazes abordagens no combate a doenças microbianas. Estudos recentes suportam a hipótese de que a terapia fotodinâmica (TFD) possa representar uma alternativa viável para este fim. Esta terapia representa um tratamento antibacteriano, antifúngico, e antiviral alternativo para organismos que são resistentes as drogas (GAD; ZAHRA; HASAN et al., 2004; ZEINA; GREENMAN; CORREY et al., 2002; DEMIDOVA, HAMBLIN, 2005).

A TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante ou FS não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. Na presença de oxigênio encontrado nas células, o FS pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres

(reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singleto. Ambos os caminhos podem levar à morte celular. O oxigênio singleto reage com quase todos os componentes celulares uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, susceptíveis à ação do oxigênio singleto. Como a primeira barreira para este elemento é a membrana celular e esta contém lipídeos insaturados que podem ser danificados, ocorre a inativação bacteriana (HOPPER, 2000; BIEL, 2002). Os hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reações catalíticas. Uma vez que a reatividade das ROS com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a TFD. Com essa multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência celular, sendo esta uma das principais vantagens da fotossensibilização (CARRÉ et al., 1999).

Estudos da década de 90 (WILSON; DOBSON; SARKAR; 1993; WILSON; DOBSON; HARVEY; 1992; WAINWRIGHT, 1998) mostravam que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas eram susceptíveis a essa terapia. Assim sendo, adaptou-se a utilização desta técnica, empregada inicialmente, a pacientes oncológicos para o combate a bactérias bucais.

Em Odontologia, essa ferramenta torna-se de importante valor, pois já foram identificadas cerca de mil diferentes espécies de microorganismos na cavidade bucal de seres humanos. Dentre esses microorganismos, há aqueles que são patogênicos e relacionados às principais doenças estudadas na área, como a cárie dentária e a doença periodontal.

2.6.1 Estudo da terapia fotodinâmica (TFD) em bactérias bucais

Os primeiros trabalhos utilizando a TFD sobre bactérias bucais foram realizados por Wilson, Dobson e Harvey (1992). Neste momento, o maior interesse dos autores era descobrir compostos químicos que pudessem ser efetivamente utilizados como FS na terapia fotodinâmica. Nesse estudo foram testados 27 compostos e 16 deles tinham capacidade de eliminar o S.

sanguinis quando associados a um laser HeNe. Os mais efetivos foram o azul de orto-toluidina (TBO), azul de metileno, alumínio dissulfonado fitalocianino (AlPcS₂), o cristal de violeta e dihematoporfirina éster (DHE). No mesmo estudo, TBO e azul de metileno mostraram-se eficazes na redução de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans in vitro*. Para todas as situações, a utilização do corante sem a ação concomitante da luz laser não surtiu efeito significativo sobre a viabilidade dos microorganismos testados.

A ação antimicrobiana da TFD sobre bactérias cariogênicas foi testada por Burns, Wilson e Pearson (1993). Para isso, os autores realizaram dois experimentos distintos, nos quais um aparelho de laser hélio-neônio (He-Ne) foi associado ao corante azul de toluidina. O corante foi adicionado a suspensões celulares de *S. sobrinus*, *S. mutans*, *L. casei* e *A. viscosus*, utilizando-se concentrações de 100, 50 e 25 mg/L. Uma alíquota de 1 mL da cada suspensão bacteriana foi transferida para placas de Petri e diferentes áreas de cada placa foram expostas a luz laser durante os tempos de 15 a 300 segundos. Para o segundo experimento, 100 µL de cada suspensão bacteriana foram transferidos para orifícios de uma placa de microtitulação, juntamente com o mesmo volume do corante em várias concentrações, e em seguida a placa foi exposta ao laser. Os resultados obtidos nos dois experimentos demonstraram que a inativação dos microorganismos ocorreu de forma dependente dose X concentração. Para o primeiro teste, foram observadas zonas de inibição nas placas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. viscosus* após 15 segundos de exposição ao laser e o *L. casei* após 45 segundos, quando a concentração do corante foi de 100 mg/L. A utilização de concentrações menores do corante necessitou de maiores tempos de iluminação para que fosse conseguida a inativação das quatro bactérias testadas. Seguindo esse mesmo raciocínio, para o segundo experimento, os resultados demonstraram significativa redução nos valores de UFC/mL de todos os microorganismos testados após a exposição por 60 segundos ao laser (33,6 J/cm²), quando o corante foi utilizado na concentração de 50mg/L. Entretanto, esta concentração do agente mostrou-se tóxica às células microbianas do *S. mutans* e *S. sobrinus*, na ausência de luz. A exposição ao laser sem a presença do corante não afetou significativamente a viabilidade das bactérias testadas.

Para corroborar com os achados em culturas planctônicas e ainda verificar possíveis efeitos deletérios da TFD sobre células de mucosa bucal de humanos, Soukos, Wilson e Burns (1996) avaliaram os efeitos fotodinâmicos sobre amostras de *S. sanguis* e culturas celulares de fibroblastos e queratinócitos. Para isto, utilizaram como fonte de luz o laser de HeNe (7,3 mW, 638 nm) variando o tempo de exposição por 1 a 2 minutos, o que resulta numa exposição a potências de 438 mJ a 876 mJ, respectivamente e o corante azul de toluidina a 2,5 µg/mL e 5 µg/mL. O microrganismo selecionado cresceu em ambiente anaeróbio por 16 horas no meio de cultura TSB. Os corantes foram adicionados às culturas de *S. sanguis*, sendo adicionado meio de cultura aos grupos controle. O tempo de pré-irradiação (tempo de contato entre o corante e a cultura) foi determinado em 5 minutos. Alíquotas de 1 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para placas de Petri e cultivados por uma hora sob a temperatura de 37°C e foram inoculadas em caldo de tryptone soya agar (TSA). Diferentes áreas da placa, em duplicata, foram irradiadas variando o tempo entre 60 a 120 segundos. Depois da incubação por 24 horas, os discos foram examinados para verificação de zonas de inibição de crescimento e então reencubadas por 48 horas e avaliadas quanto ao crescimento dessas zonas. Os resultados mostraram que as culturas do microrganismo foram eliminadas após exposição ao laser pelo tempo de 75 segundos (547 mJ, 42,1J/cm²) na concentração do corante em 2,5 µg/mL. Partindo-se desses parâmetros, as culturas de fibroblastos e queratinócitos foram submetidas aos parâmetros. Os resultados demonstraram que não houve morte celular quando da aplicação do mesmo protocolo e, ainda mais, a viabilidade foi averiguada quando as células foram submetidas a irradiações de até 2 minutos. Nem o corante e nem a luz laser quando aplicados isoladamente, tiveram efeitos detectáveis quanto à variável crescimento. Estes resultados foram animadores e são indicadores da segurança e a eficácia da terapia.

Wainwright (1998) teve por objetivo, por meio da revisão da literatura, apresentar uma vasta gama de FS e corantes disponíveis, além de discorrer sobre o termo *PACT (Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy)*. Segundo o autor, os derivados de hematoporfirina são os mais utilizados na TFD do

câncer e são classificados como FS de primeira geração. Os FS correspondentes produzidos na Alemanha e Rússia são, respectivamente, Photosan[®] e Photogem[®]. Os derivados da hematoporfirina são formados pela combinação de FS derivados do sangue e foram os primeiros agentes a receber autorização para uso para aplicação clínica da TFD. Considerações quanto às ftalocianinas também foram feitas. O autor afirma que embora elas também sejam consideradas como derivadas de porfirinas, seu caráter aromático grandemente aumentado explica a absorção mais intensa desses compostos no infravermelho próximo comparada àquela dos núcleos de porfirina originais. Como um FS, as ftalocianinas fornecem alto rendimento de produção de oxigênio singleto. Os corantes fenotiazínicos exibem intensa absorção de 600-660 nm, região do espectro útil em TFD por estar na janela terapêutica requerida para eficiente penetração da luz nos tecidos. Azul de metileno e azul de toluidina são seus exemplos mais marcantes e eficazes. O autor ainda faz considerações quanto aos parâmetros que devem ser levados em consideração para a utilização de agentes fototerapêuticos, tais como, solubilidade, estabilidade em solução aquosa, habilidade para transporte ativo ou passivo, alto rendimento quântico, biocompatibilidade (toxicidade baixa ou nula aos tecidos vizinhos), eficiência na geração de oxigênio singleto e capacidade de penetração na membrana celular. Em relação às fontes de luz empregadas as mais utilizadas são em geral, os lasers. Contudo, ele descreve que as melhores fontes de luz são aquelas que a um baixo custo, forneçam a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos. Uma opção viável é o diodo emissor de luz (LED). Existem atualmente lasers diodo cobrindo praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, podendo, dessa forma, atender boa parte dos agentes fototerapêuticos já existentes no mercado.

Em suspensões planctônicas, a chance de sucesso da TFD é bem maior quando comparada a bactérias organizadas em biofilmes, devido à reduzida susceptibilidade a agentes antimicrobianos (WILLIAMS et al., 2003). Partindo-se deste princípio e sabendo-se que grande parte das espécies de microrganismos presentes na cavidade bucal encontra-se organizada na forma

de biofilmes, o foco das pesquisas em anos posteriores foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre biofilmes dentários (WOOD et al., 1999).

Foi observado que bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fenotípicas distintas das culturas planctônicas, resultando no aumento da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001; PRATTEN; WILSON, 1999).

Wood et al. (1999) propuseram-se a avaliar o fator resistência bacteriana ao perceberem distintos comportamentos em culturas planctônicas bacterianas e organizadas em biofilmes. Sendo assim, tornou-se objetivo do trabalho, avaliar possíveis efeitos letais da TFD sobre biofilmes bucais formados *in situ*. Para isso, utilizaram como FS o zinco piridínio (II) (PPC), uma ftalocianina sintetizada no Centro de Fotobiologia e Terapia Fotodinâmica da Universidade de Leeds. Oito voluntários foram selecionados e, em seus molares superiores antagônicos, em cada um foram fixados um dispositivo formado com anéis de nylon e tendo a base formada por esmalte, com o intuito de acumular biofilme bacteriano. Foram fixados dois dispositivos com o intuito de um ser utilizado para a aplicação da TFD e o outro servir como controle. Estes dispositivos foram aderidos às superfícies dentárias por meio de sistema adesivo e resina composta fotopolimerizável. Estes dispositivos ficaram na cavidade bucal durante sete dias, sendo após isso, removidos e colocados em solução estéril a um pH de 8,0. Logo após a retirada, a solução (biofilme + solução estéril) foi incubada com PPC a uma concentração de 20 µg/mL. Os dispositivos foram lavados 3 vezes com solução estéril, tomando-se cuidado para não romper o biofilme e então foram irradiados por 30 minutos utilizando uma luz branca de um filamento de tungstênio de 400 W de potência com dosimetria de 22,5 mW/cm² num comprimento de onda numa faixa de 600 a 700nm (correspondendo a região de máxima absorção do corante). As amostras controle também foram expostas à luz e a droga isoladamente. Todas as amostras, após o procedimento da TFD, foram analisadas por microscopia confocal e por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados mostraram que as bactérias no biofilme, após a TFD, apresentaram vacuolação do citoplasma e danos à membrana celular, sendo estes acontecimentos claramente vistos pelos métodos empregados.

O objetivo do estudo de Rovaldi et al. (2000) foi testar um novo derivado de porfirina que apresenta largo espectro de ação, tanto contra bactérias gram positivas quanto negativas (ce6 – 5K). Para a pesquisa, os autores fizeram uso de culturas ATCC de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum polymorphum*, *A. viscosus*, e estreptococos. A fonte de luz utilizada foi um laser diodo (10 mW, 662 nm, 15 J/cm²) e o FS (clorina ce6 – 5K) foi utilizado nas concentrações: 0, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5 e 5 µM. Todas cresceram atingindo níveis de 10⁷ UFC/mL. O agente fotossensibilizador foi adicionado a 1mL da suspensão bacteriana durante 2 minutos. Após isso, 200 µL da suspensão foram transferidos para uma placa contendo 48 poços para o procedimento da TFD. As amostras foram expostas durante 150 segundos e a taxa de fluência foi de 100mW/cm². Após incubação, as células foram contadas por meio de unidades formadoras de colônia (UFC). Os autores concluíram que houve considerável morte celular quando as culturas foram submetidas a maiores concentrações do FS (5 µM) e submetidas a menores tempos de exposição (19 s).

A comparação dos efeitos fotodinâmicos de dois corantes foi avaliada no estudo conduzido por Usacheva; Teichert; Biel et al. (2001). Os autores verificaram a susceptibilidade de microrganismos gram positivos e gram negativos cultivados em culturas planctônicas por meio da utilização do azul de metileno e azul de toluidina. Suspensões celulares contendo 50 µL de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *H. influenzae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram pipetadas em placas de Petri com meio de cultura específicos e realizada a contagem inicial para a realização dos experimentos. A fotossensibilização das amostras foi realizada com diferentes concentrações dos corantes (10 – 200 µM), sendo utilizado o laser de argônio e um laser diodo, emitindo luz vermelha a 630 e 664 nm, respectivamente. Todas as amostras foram submetidas à incubação por uma hora em ambiente escuro, com diferentes concentrações dos corantes, com o intuito de se verificar efeitos citotóxicos aos microrganismos, após esse procedimento, as amostras foram irradiadas pelas fontes de luz, sendo novamente modificadas as concentrações dos FS. Após o tratamento fotodinâmico, as suspensões foram diluídas e alíquotas de 0.5 mL foram utilizadas para semear a superfície de ágar sangue. As placas de Petri

foram incubadas por 24 horas a 37°C quando foi feita nova contagem de UFC/mL. Os autores durante a TFD, num primeiro momento, fixaram a intensidade de luz, mas a fluência variou de 10 a 60 J/cm². Num segundo momento, a fluência foi fixada, contudo a intensidade variou de 50 a 100 mW/cm². Os resultados demonstraram que todas as suspensões expostas à luz laser na presença dos corantes foram erradicadas. Além disso, resultados significativos de fotodegradação foram observados quando do aumento da fluência e intensidade. Assim, o grau de dano fotodinâmico foi dependente do corante utilizado, a sua concentração, a fluência/ intensidade da luz laser e do gênero bacteriano. Especial atenção foi dada ao azul de toluidina, devido a sua maior atividade fotobactericida por apresentar comportamento hidrofóbico mais pronunciado, o que facilita sua entrada na membrana bacteriana, maior efeito citotóxico às bactérias no período de incubação no escuro, devido à sua alta capacidade em formar dímeros, os quais são responsáveis pelo efeito fotodestrutivo e a sua concentração mínima para se atingir a fase de “platô” (indicação da eficácia fotobactericida) variou de 1,5 a 7 vezes menor ao se comparar com os resultados do azul de metileno.

Uma das maiores preocupações dos pesquisadores em terapia fotodinâmica é causar injúrias aos tecidos adjacentes à aplicação da terapia. Com o intuito de se verificar uma possível extrapolação dessa técnica na clínica, Kömerik et al. (2002), propuseram-se a avaliar a validade da terapia em mucosa bucal de ratos, os quais apresentavam uma doença infecciosa mediada por bactérias. Utilizaram, para tal fim, o corante azul de toluidina em diferentes concentrações (25, 50 e 200 µg/mL) e um laser vermelho (6mm de diâmetro, 633 nm) variando-se sua dosimetria (110,170 e 340 J/cm²) em somente um lado. Para o lado controle, foram utilizados, independentemente, 200 µg/mL do corante e uma dosimetria de 340 J/cm² do laser. Todos os ratos foram sacrificados e, após 72 horas, foram obtidas amostras para se realizar o exame histológico e a imagem digital por fluorescência. Verificaram a ausência de mudanças inflamatórias ou necróticas para ambos os lados, concluindo que, nos parâmetros utilizados, a TFD parece ser uma abordagem segura para o tratamento de infecções bucais sem danos aos tecidos adjacentes.

No ano de 2004, Hamblin e Hasan discorreram sobre a eficácia da TFD como uma nova terapia antimicrobiana na forma de uma revisão de literatura. Neste trabalho, os autores discorrem sobre a susceptibilidade das bactérias gram positivas ao processo fotodinâmico e a dificuldade em se erradicar culturas formadas por bactérias gram-negativas. Além disso, discute os principais FS utilizados na TFD e até novos compostos, os quais facilitaram a entrada dos FS nas bactérias gram-negativas, como é o caso do PMBN (polycationic peptide polymyxin B nonapeptide). Fizeram referências aos mecanismos de danos celulares causados às bactérias, à susceptibilidade e resistência daquelas frente a terapia, à técnica em modelos animais e aplicações clínicas. Os autores concluem que a TFD poderá, num futuro próximo, ser largamente utilizada em infecções microbianas localizadas, em feridas infectadas, infecções cutâneas, após remoções de abscessos, a fim de se certificar de total eliminação dos microrganismos, no combate a sinusites agudas e crônicas, em doenças periodontais, injetando-se o FS diretamente na bolsa infectada e em infecções córneas. Eles atentam para o fato desta terapia ser de alto impacto na sociedade, devido a tornar-se uma alternativa viável que não gera resistência no hospedeiro e, além disso, poder ser aplicada inúmeras vezes.

No mesmo ano, um estudo de Wilson (2004) viria a confirmar as vantagens da TFD em bactérias cariogênicas, periodontopatogênicas e na desinfecção de canais radiculares. Quanto as primeiras, o autor simulou uma lesão de cárie em amostras de dentina, a qual estava envolvida por biofilme dentário altamente cariogênico. Neste meio, tratou o biofilme com azul de toluidina numa concentração de 13 µg/mL em associação a uma luz laser (632 nm, 4.8 J) atingindo uma redução de 9 log₁₀ na contagem de células viáveis. Numa segunda fase, simulou novamente lesões de cárie, e submeteu os espécimes a 10 µg/mL durante 60 segundos e então as irradiou com os mesmos parâmetros da luz anterior. Como resultado, obteve uma taxa de redução bacteriana atingindo quase os 99%. A conclusão a que chegaram é que, caso fosse extrapolado para a rotina clínica, somente a dentina infectada seria removida, preservando muito mais tecido sadio, além de gerar uma desinfecção da área, diminuindo as chances de recidivas de cárie,

apresentando-se um procedimento muito menos traumático ao paciente e mais rápido ao cirurgião-dentista.

A utilização de um novo FS – rosa de bengala (derivado de um xanteno) – foi utilizado no estudo de Paulino et al. (2005) com o intuito de inviabilizar culturas de *S. mutans*. Na pesquisa, a fonte de luz utilizada foi um fotopolimerizador odontológico (400 – 500 nm, 350 – 500 mJ/cm²) e o FS utilizado em diferentes concentrações (0,01 – 10 µM). A banda de absorção do agente é considerada coincidente com a emissão do espectro do fotopolimerizador, sugerindo que a fonte de luz pode fotoativar o corante, formando espécies reativas com eficiência. Em concentrações do corante a 0,5 µM, associadas à irradiação com intensidade de 325,1 mJ/cm² (30 s), os resultados mostraram 100% de morte bacteriana, enquanto que para as amostras irradiadas na ausência do corante, a viabilidade celular não foi afetada. Para se determinar a efetividade da TFD, os autores incubaram, previamente a este procedimento, o corante (0,5 µM) às culturas por 10 minutos. A mortalidade celular foi dose dependente da dosimetria variando de 54,5 a 216,6 mJ/cm². Doses acima deste valor (correspondente a 20 s de irradiação) até 433,2 mJ/cm² causaram 100% de morte celular. Os autores sugerem que estes estudos sejam realizados em modelos animais, para que, no futuro, esta terapia possa ser disponível para a área clínica.

A comparação da eficácia da TFD utilizando duas diferentes fontes de luz foi o objeto do estudo de Zanin; Gonçalves; Junior et al. em 2005. Nesta pesquisa os autores utilizaram como agente FS o corante azul de toluidina (TBO) a uma concentração de 100 mg/L. Como fonte de luz usaram diodo emissor de luz (LED) e laser de hélio-neônio (He-Ne) sobre biofilmes cariogênicos cultivados durante 10 dias sobre fatias de dentina *in vitro*. Para a TFD, os biofilmes foram retirados no terceiro, sétimo e décimo dia e inoculados com 25 µL de TBO por 5 minutos. Após este período, os biofilmes foram irradiados pelas duas fontes de luz por 5, 15 e 30 minutos. A potência das duas fontes utilizadas foi de 32 mW e a dosimetria, correspondente a cada período de tempo, foi de 49, 147 e 294 J/cm², respectivamente. Após o procedimento terapêutico, as amostras foram submetidas ao vórtex por 60 s com o intuito de dispersar o biofilme e, a seguir, alíquotas foram transferidas para placas de

Petri contendo o meio BHI e então incubadas anaerobicamente a 37°C durante 3 dias para contagem das células viáveis. Os resultados demonstraram que houve inviabilidade celular somente quando houve a associação do TBO às fontes de luz, com quase 100% de redução bacteriana. Também foi encontrado que o efeito bactericida é luz/tempo - dose dependente e que os biofilmes em que a TFD foi aplicada no décimo dia (biofilmes mais maduros) apresentaram-se menos susceptíveis à TFD. Como conclusão, os resultados do estudo mostraram que os biofilmes foram susceptíveis às duas fontes de luz na presença do TBO, sugerindo que esta abordagem possa ser utilizada para o combate à cárie dentária.

No estudo de Metcalf et al. (2006) os autores propuseram a utilização de tempos de irradiação fracionados ao invés da irradiação contínua sobre biofilmes contendo *S. mutans*. O laser foi utilizado como fonte de luz neste experimento apresentando 22,7 mW/cm² e 6,75 J/cm² (5 minutos de tempo de pré-irradiação) e como agente FS foi utilizado o corante eritrosina a 22 µM. Os biofilmes foram incubados por 15 minutos no escuro (tempo de pré-irradiação) e submetidos à irradiação por 0, 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos, continuamente. Neste experimento, os biofilmes de *S. mutans* contendo inicialmente 10¹¹ UFC/mL apresentaram, após 5 minutos de irradiação, uma redução de aproximadamente 98% de células viáveis. Em resposta a este resultado, os autores decidiram fracionar os regimes de irradiação da seguinte forma: cinco irradiações de 1 minuto e entre as irradiações esperou-se um período de 5 minutos no escuro; dez irradiações de 30 segundos e entre as irradiações esperou-se um período de 2 minutos no escuro e comparar com um regime contínuo de irradiação por 5 minutos. Para o primeiro esquema de irradiação obteve-se uma diminuição de 3 log₁₀ e para o segundo, 3,7 log₁₀. Para a irradiação contínua houve uma diminuição de 2 log₁₀. Ambos os regimes fracionados obtiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao regime contínuo, contudo não houve diferença estatística entre ambos. Para o segundo fracionamento (10 X 30s) ao extrapolar os resultados para 30 minutos, os resultados foram significativamente maiores quando comparados ao regime contínuo (2,8 log₁₀). Este estudo demonstra que pequenas doses de irradiação em regime fracionado apresentam resultados

tão satisfatórios quanto regimes contínuos de irradiação. Contudo, estudos devem ser feitos com o intuito de se verificar a eficácia do corante eritrosina em biofilmes formados *in vivo*.

Ainda testando-se a efetividade do corante eritrosina, Wood et al. (2006) propuseram-se a testar sua eficácia, comparando-a ao Photofrin[®] e ao azul de metileno sobre biofilmes cariogênicos. Neste estudo, um laser emissor de luz branca foi utilizado (500-650 nm, 22,5 – 22,7 mW/cm²) e todos os FS utilizados apresentaram-se sob a concentração de 22 µM. Todas as amostras foram pré-irradiadas por 15 minutos e após a TFD, foi obtido o número de células viáveis. A eritrosina mostrou ser o agente fotossensibilizador mais eficaz na redução bacteriana, sendo dependente da idade do biofilme crescido (0 – 288 horas), sendo 1 – 2 log₁₀ mais efetiva que o Photofrin[®] e de 0,5 – 1 log₁₀ mais efetiva que o azul de metileno.

No ano de 2007, um estudo (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007) enfocou a TFD como temática, realizando extensa revisão de literatura acerca do assunto, objetivando a reação fotodinâmica, a utilização de FS, mecanismo de inativação dos microrganismos, fontes de luz, efeitos da terapia em biofilmes orais, estudos *in situ* e *in vivo* e perspectivas futuras. Afirmaram também que a TFD parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por microrganismos, tais como amplo espectro de ação, a inativação de microrganismos e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. Além disso, tem se mostrado capaz de promover atividades citotóxicas contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoários.

Colaborando com estudos em culturas planctônicas, Bevilacqua et al. (2007) investigaram o efeito da TFD sobre suspensões bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC). Neste estudo foram utilizados o azul de toluidina (TBO, 100mg/mL) e um diodo emissor de luz (LED, 600-670 nm) com o pico em 640 ± 20 nm. As suspensões foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas, apresentando uma contagem inicial de 1,5 X 10⁸ células por mL do meio de cultura. Os grupos foram separados da seguinte forma: Grupo (1) – controle negativo – não foi inoculado com bactérias, nem irradiado e nem incubado com o corante. Grupo 2 - controle positivo – os tubos foram inoculados com 1 mL de bactérias e 1 mL de solução salina, não sendo irradiado nem incubado com o

corante. Grupo 3 – os tubos foram inoculados com 1 mL de bactérias e 1 mL do corante, utilizando-se o tempo de pré-irradiação de 5 minutos, após isso foram incubados por 48 horas. Grupo 4 – os tubos foram inoculados com 1 mL de bactérias e 1 mL de solução salina. Este conjunto foi então transferido para discos de Petri e irradiados com o LED, seguindo – se o protocolo: dosimetria ($2,18 \text{ J/cm}^2$), energia (21 J), potência (0,116 W), área irradiada ($9,62 \text{ W/cm}^2$) e tempo (180 s). Grupo 5 – os tubos foram inoculados com 1 mL de bactérias e 1 mL do corante. Esta solução foi transferida para discos de Petri, permanecendo por 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Os discos foram então irradiados, seguindo-se os mesmos parâmetros do grupo anterior e depois incubados em condições microaerofílicas por 48 horas. Para todos os grupos, três amostras foram obtidas e analisadas, qualitativamente, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em aumentos de 100, 1000 e 5000 vezes e quantitativamente por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para a análise qualitativa houve redução bacteriana nas amostras dos grupos 1 e 5, em que não houve crescimento bacteriano considerável em todos os aumentos. Em relação à análise quantitativa, a contagem de *S. mutans* mostrou, em relação ao grupo 2 (controle positivo) para o grupo 3 (presença do FS e meio de cultura), 4 (presença do meio de cultura e LED) e 5 (aplicação da TFD), reduções de 28,4 %, 23,4% e 100%, respectivamente.

Por tais fatos, torna-se de suma importância o desenvolvimento de estudos objetivando aperfeiçoar a TFD e avaliar sua ação sobre os microorganismos potencialmente cariogênicos. Contudo, são encontradas poucas pesquisas que utilizam isolados clínicos de seres humanos para essa finalidade terapêutica. Atualmente, já se tem conhecimento de quais FS apresentam efeitos antibacterianos com sucesso, porém não há um consenso quanto à concentração ideal dos mesmos. Dilema similar dá-se quanto à fonte de luz e à dosimetria empregada, porém estudos demonstram resultados animadores quando do uso de diodos emissores de luz (LED's) (MACHADO, 2000).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como propósito avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (TFD) no controle do crescimento microbiológico de uma cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e de dois isolados clínicos de *S. mutans* (43513 e 47513) em função da concentração mínima do corante azul de ortotoluidina (TBO) e da dose mínima de diodos emissores de luz (LED's) no comprimento de onda vermelho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho, sob o número de processo 032/2008, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) que emitiu parecer favorável ao desenvolvimento do mesmo (ANEXO).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras microbiológicas utilizadas

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes culturas:

1. Uma cultura de *S. mutans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC, nº 25175), Manassas, EUA;
2. Duas culturas de isolados clínicos de *S. mutans* (43513 e 47513) fornecidas pelo Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

4.1.2 Materiais de consumo

1. Água destilada;
2. Meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), produzido por Becton, Dickinson and Company Sparks, USA Lote nº 7354968;
3. Ponteiras descartáveis para micropipeta produzidas por Axygen;
4. Microtubos para centrífuga do tipo eppendorfs graduados (2,0 mL) produzido por Axygen, USA;
5. Solução – tampão PBS;
6. Meio de cultura SB 20;

6. Sal fenotiazínico azul de orto-toluidina (TBO) produzido por Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, T3260;

7. Placa de orifícios Costar[®] com 96 cavidades de fundo chato estéril produzida por Corning Incorporated, USA;

4.1.3 Instrumentos

1. Placas de Petri descartáveis 90 X 15 mm lisa fabricadas por CP Cralplast;

2. Tubos de ensaio 13 X 100 mm fabricados por Pyrex;

3. Pipetador;

4. Béquer graduado;

5. Erlenmeyer graduado;

6. Frasco alemão;

7. Micropipetas de 1-20 μ L, 100-1000 μ L e multicanal de 1-300 μ L;

8. Bico de Bunsen;

9. Alça de platina para semeadura de microrganismos;

10. Balança de precisão modelo Acculab V-200;

4.1.4 Equipamentos

1. Autoclave vertical fabricada por Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara-SP, modelo: AV - SD75 n^o de série: 8-81;

2. Estufa de cultura, produzida por Fanem Ltda, São Paulo – SP, modelo: 002 CB;

3. Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada por Pachane Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba-SP, modelo: 400 e n^o de série: 14407;

4. Centrífuga para tubos de microcentrífuga do tipo eppendorf fabricada por Brinkman Instruments, Inc, USA, modelo: Centrifuge 5415C;

5. Vórtex Mixtron produzido por Leucotron Equipamentos Ltda., Santa

Rita do Sapucaí-MG e nº de série: 805/20;

6. Espectrofotômetro produzido por Pharmacia Biotech, UK, modelo: 80-2109-10 e nº de série: 73500;

7. Mesa difusora de iluminação com LED's vermelhos (620 - 660nm) com densidade de potência de saída de constante de 400 mW/cm² desenvolvida pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo intitulada "*Bio Table*".

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo dos materiais microbiológicos

O meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) foi preparado para a reativação das espécies utilizadas neste estudo. Esse meio constitui-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos. A manipulação e a esterilização foram realizadas segundo as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio utilizou-se uma proporção de 37 g de pó do meio para 1000 mL de água destilada. O pó foi pesado e colocado em um frasco alemão e a água adicionada em seguida. Após a dissolução, o meio foi distribuído em tubos de ensaio. Uma alíquota de 2 mL foi pipetada e distribuída em cada um dos tubos e em seguida levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após esse procedimento, os tubos de ensaio foram colocados em estufa bacteriológica a 37°C para teste de esterilidade por 24 horas e finalmente armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

Para o PBS utilizado nas diluições seriadas e para a lavagem das suspensões bacterianas foi preparado pela diluição completa de 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,38 g de Na₂HPO₄ · 2 H₂O em 100 mL de água destilada. Para o procedimento da dissolução foi utilizado um béquer com o auxílio de uma haste de vidro. Após a dissolução, a solução resultou numa concentração de 0,01

mol, sendo o volume final transferido para um frasco alemão e armazenado em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

4.2.2 Procedimento de terapia fotodinâmica (TFD)

Para a fotossensibilização das amostras foi utilizado o corante azul de orto-toluidina (TBO) (Figura 1).



Figura 1: Azul de orto toluidina (TBO) utilizado no estudo

Para a preparação da solução estoque inicial de TBO, utilizou-se 0,5 g do pó, previamente pesado, sendo diluído em 100 mL de água destilada estéril. Sendo assim, a solução resultante apresentou uma concentração inicial de 5mg/mL (5000µg/mL) a qual foi armazenada em um tubo de ensaio envolvido em papel alumínio para proteção de luz à temperatura de 5°C.

Para as concentrações utilizadas no presente estudo foram obtidas quatro diluições seriadas a 10 vezes. Sendo assim, para a obtenção da

primeira concentração, uma alíquota de 1,8 mL de PBS foi pipetada no interior de um microtubo e a este foi adicionado 0,2 mL da solução estoque inicial de TBO. A solução resultante obtida, então com 2 mL, apresentou a concentração inicial de 0,5 mg/mL (500 µg/mL). Posteriormente, 0,2 mL desta primeira solução foi transferida para um microtubo contendo 1,8 mL PBS obtendo-se assim uma solução do corante a uma concentração de 0,05 mg/mL (50 µg/mL). Esse mesmo procedimento foi repetido por mais 2 vezes, obtendo-se assim, concentrações finais do corante de 0,005 mg/mL (5µg/mL) e 0,0005 mg/mL (0,5 µg/mL). Após as diluições, cada microtubo foi agitado vigorosamente em vórtex para a completa homogeneização da mistura e alíquotas de 100 µL de cada concentração obtida foram transferidos, em duplicata, para poços de uma placa de 96 orifícios.

Ao final desta primeira etapa, obtiveram-se quatro concentrações do corante: 500, 50, 5, 0,5 µg/mL. Para o estudo, a efetividade da TFD foi avaliada nas seguintes concentrações: 250, 25, 2,5 e 0,25 µg/mL. Para isso, quando as soluções iniciais foram adicionadas às suspensões bacterianas (100 µL), a concentração do agente foi diminuída a metade, atingindo-se as concentrações desejadas.

É importante ressaltar que o corante utilizado é uma substância fotossensível, isto é, pode sofrer degradação de seus componentes quando exposto à luz. Assim, a manipulação deste agente durante o preparo da solução estoque e posteriormente na fotossensibilização dos microrganismos foi realizada em ambiente escuro.

Para a avaliação da efetividade da TFD na inativação dos microrganismos foram testadas 4 dosimetrias: 12 J/cm², 24 J/cm², 36 J/cm² e 48 J/cm². Como a fonte de luz utilizada possui potência constante, a variação da dose de luz foi realizada pela variação do tempo de exposição das amostras microbiológicas à luz vermelha da “*Bio Table*”. Assim os tempos de iluminação utilizados foram 30, 60, 90 e 120 segundos, respectivamente. Os cálculos realizados para a obtenção dos tempos de iluminação estão descritos no Apêndice 1.



Figura 2: dispositivo utilizado no estudo como fonte de luz denominado “Bio Table”

4.2.3 Amostras utilizadas no estudo

Os microrganismos utilizados para o presente estudo foram uma cepa padrão de *S. mutans* (ATCC) e duas culturas de isolados clínicos de *S. mutans* de crianças com idade inferior a 24 meses de idade estocadas em um freezer a - 85°C e fornecido pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP). Essas três cepas testadas foram armazenadas em meio de cultura BHI acrescido de glicerol a 20%.

Para a o início da fase experimental, os microrganismos utilizados foram descongelados e repicados em meio de cultura e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após a incubação e verificação do crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura, estes foram semeados em placas de Petri contendo o meio SB 20 ágar (sacarose bacitracina 20% de glicose) para observar a morfologia colonial e pureza das amostras. Em seguida foram repicadas em caldo BHI para se obter um crescimento de 12 a 18 horas do inóculo para a utilização no trabalho,

respeitando-se a curva logarítmica de crescimento. Uma alíquota de 2mL foram transferidos para tubos de microcentrífuga do tipo eppendorf e, em seguida, centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as bactérias (sedimentado) foram ressuspensas em 2 mL de PBS. O tubo foi agitado novamente por 2 minutos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos, sendo as suspensões bacterianas ressuspensas em PBS. Para a preparação do inóculo, um total de 20 mL de PBS foi transferido para o interior do tubo de ensaio e a este foi acrescido uma concentração da suspensão lavada até que o grau de turvação no interior do tubo fosse visualmente semelhante com o padrão da escala (0,5 escala McFarland), sendo que para tal procedimento foi realizada leitura ao espectrofotômetro. Dessa forma, foram obtidas suspensões bacterianas padronizadas em uma mesma concentração celular (10^6 células/mL).

4.2.4 Situações experimentais estudadas

A susceptibilidade das três cepas ao processo fototerapêutico foi avaliada por meio da exposição das suspensões bacterianas a quatro concentrações do corante (250, 25, 2,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) e quatro dosimetrias (12, 24, 36 e 48 J/cm^2) no comprimento de onda vermelho (predominantemente em 630 nm). Assim, para cada microrganismo, foram testadas 16 condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento das quatro dosimetrias com as quatro concentrações do corante avaliado denominadas de C+L+. Sendo a letra C, sigla para o corante e L para luz. Os símbolos + (positivo) e - (negativo), indicam presença ou ausência dos fatores estudados. Além disso, o efeito da aplicação para cada concentração do corante foi estudada (C+L-) e de cada dosimetria (C-L+) também foi avaliado sobre as suspensões bacterianas, totalizando 24 situações experimentais. Adicionalmente, as amostras referentes ao controle positivo não foram fotossensibilizadas nem submetidas à luz (C-L-). Sendo assim, foram obtidas 25 situações experimentais que avaliaram a efetividade da terapia fotodinâmica sobre as

cepas estudadas. Essas condições estão descritas na Tabela 1 do Apêndice 2.

Para melhor compreensão, as condições experimentais avaliadas foram descritas em formato de tópicos e subdivididos em cinco grupos (C+L+; C+L-; C-L+; C-L-; controle negativo) com o intuito de descrever as etapas:

C+L+

Nesta situação experimental as três cepas foram fotossensibilizadas com o corante nas quatro concentrações teste e nas quatro dosimetrias determinadas. Sendo assim, para cada cepa avaliada, alíquotas de 100L de TBO foram transferidas para 8 poços de uma placa de 96 orifícios. Para cada concentração do corante utilizada foram utilizados dois orifícios constituindo amostras em duplicata. Aos 8 orifícios foram transferidos 100 µL de suspensão bacteriana utilizando-se uma micropipeta do tipo multicanal. A placa de orifícios, contendo as soluções resultantes, foi então deixada em repouso em ambiente escuro pelo tempo de 120 segundos (tempo de pré-irradiação). Decorrido esse período, a placa foi levada sobre o vidro difusor da “*Bio Table*” e o dispositivo foi então acionado e todos os orifícios foram iluminados simultaneamente pelo mesmo período de tempo eleito.

Este procedimento descrito anteriormente foi realizado de forma a avaliar as quatro dosimetrias (12, 24, 36 e 48 J/cm²). Sendo assim, quatro placas de 96 orifícios com 8 amostras cada uma foram utilizadas, levando-se em conta que cada uma fora exposta ao comprimento de onda de luz vermelho pelos períodos de 30, 60, 90 e 120 segundos, respectivamente.

C+L-

Com o intuito de avaliar se a presença do corante pudesse causar algum efeito tóxico sobre as suspensões bacterianas, foram incluídas nesta situação amostras sensibilizadas com o TBO, porém sem a iluminação pelos LED's da

“*Bio Table*”. Para cada cepa avaliada, alíquotas de 100 µL de suspensão bacteriana, já diluídas em PBS, foram transferidas para 8 poços de uma placa de 96 orifícios. Cada uma dessas 8 amostras foram colocadas em contato com o corante, com o mesmo volume cada (100 µL) e então a placa foi deixada em repouso em ambiente escuro pelo tempo de 120 segundos (tempo de pré-irradiação).

C-L+

Com o intuito de se verificar possíveis efeitos deletérios da luz LED sobre as suspensões bacterianas, foram incluídas nesta situação amostras não sensibilizadas pelo TBO, sendo então substituídas por PBS, de modo a simular a presença do corante e iluminadas pelos LED's da “*Bio Table*”. Para cada cepa avaliada, alíquotas de 100 µL de PBS foram transferidas para 8 poços de uma placa de 96 orifícios. A cada uma dessas 8 amostras foram adicionados um volume de 100 µL de suspensões bacterianas. As placas de 96 orifícios foram submetidas a quatro diferentes dosimetrias (12, 24, 36 e 48J/cm²). Sendo assim, quatro placas de 96 orifícios com 8 amostras cada uma foram utilizadas, levando-se em conta que cada uma fora exposta ao comprimento de onda de luz vermelho pelos períodos de 30, 60, 90 e 120 segundos, respectivamente.

C-L-

Nesta condição experimental as amostras não foram submetidas à sensibilização pelo TBO nem pelos LED's da “*Bio Table*” de modo a serem utilizadas como controle positivo para verificar provável crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a confiabilidade do estudo. Para cada cepa avaliada, 8 orifícios foram utilizados e a estes foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana e o mesmo volume de PBS estéril. O PBS neste caso foi utilizado de modo a simular a presença do corante.

Controle negativo

De modo a averiguar se houve contaminação dos resultados obtidos, foram adicionados a dois orifícios de cada placa de 96 poços utilizadas em todas as situações, 200 μ L de PBS, com o intuito de simular o volume total avaliado pelas outras situações experimentais.

4.2.5 Análise dos achados

Após a aplicação da TFD, um volume de 100 μ L de cada amostra foram transferidos para tubos de ensaio estéreis contendo 2 mL do meio BHI. Os tubos foram então levados à estufa bacteriológica a 37^oC por 24 horas para análise da efetividade da TFD. Como forma de análise qualitativa, alíquotas da amostra da situação experimental C+L+ (TFD) foram analisadas pela semeadura e incubação em placas de Petri e pela microscopia confocal a laser.

Para a semeadura e incubação, 100 μ L de cada amostra do grupo C+L+ foram inoculadas em placas de Petri (90 X 15 mm) contendo 5 mL do meio SB 20 e espalhadas com auxílio de alça de platina esterilizada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37^oC por 72 horas em atmosfera de microaerofilia obtida pelo método da vela (GOMES; CAMPOS; TRABULSI, 1999).

Para a análise por microscopia confocal a laser, foram confeccionadas lâminas para a visualização da efetividade da TFD. Para isto, o conteúdo dos tubos de ensaio foram vertidos em tubos de microcentrífuga do tipo eppendorf e levados à centrífuga por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado ressuspenso em 50 μ L de PBS glicerina. Desta solução, 25 μ L foram transferidos para a lâmina. Sobre esta suspensão, foram adicionados 15 μ L do corante alaranjado de acridina 0,05% em PBS. Após a confecção, as lâminas foram analisadas por microscopia confocal. À

microscopia de fluorescência, o corante metacromático utilizado, ao tomar contato com as diferentes amostras bacterianas, apresenta duas diferentes colorações. Das amostras utilizadas, tanto microorganismos viáveis quanto inviáveis foram analisadas. Para as amostras viáveis, ou seja, aquelas em que a TFD não foi efetiva, não houve dano ao DNA bacteriano, sendo assim, o corante adentra a bactéria, contudo não se liga às bases nitrogenadas do material genético, emitindo fluorescência verde (Figura 3). Quando em contato com as amostras inviáveis, aquelas em que a TFD foi efetiva, apresentam o DNA bacteriano fragmentado, devido à ligação do corante às bases nitrogenadas livres emitindo, assim, a cor vermelho/laranja (Figura 4).

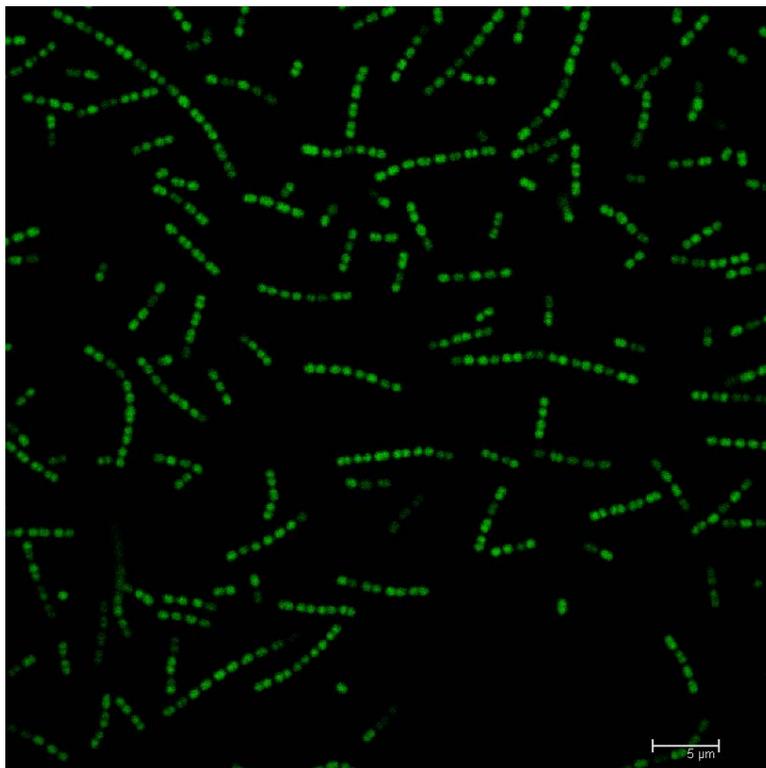


Figura 3 - Característica de viabilidade bacteriana (cor verde) à microscopia confocal a laser

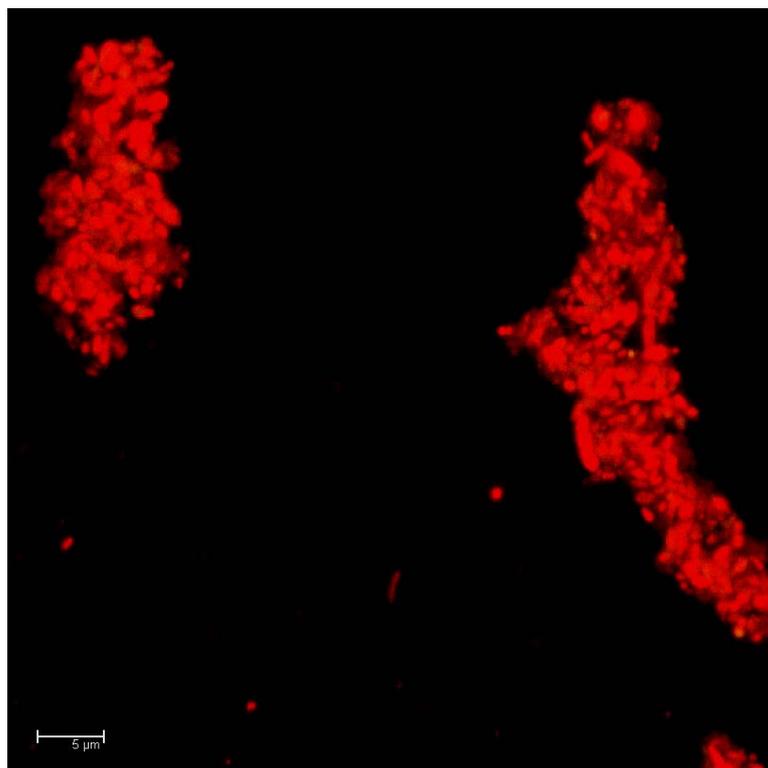


Figura 4 – Característica de morte bacteriana (cor vermelha) à microscopia confocal a laser

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) SOBRE O CRESCIMENTO DE *S. MUTANS* (ATCC 25175)

Os resultados da aplicação da terapia fotodinâmica (TFD) sobre a espécie de *S. mutans* (ATCC 25175) nas diferentes dosimetrias e concentrações do corante azul de orto-toluidina (TBO) estão descritos na Tabela 2.

Dos resultados alcançados (Tabela 2), foi possível a inibição do crescimento microbiológico (ATCC 25175) após a aplicação da TFD na dosimetria a partir de 12 J/cm² associado ao TBO na concentração de 25 µg/mL. Pode-se verificar que nas dosimetrias subseqüentes (24, 36 e 48 J/cm²) o crescimento bacteriano da espécie em questão foi controlado com concentração menor do TBO (2,5 µg/mL). A semeadura e incubação em placas de Petri e a microscopia confocal a laser foram utilizadas de modo a confirmar e ilustrar os achados. Para as amostras que sofreram, após a TFD, morte bacteriana, os resultados são extremamente semelhantes. Sendo assim, as ilustrações inseridas servem para representar a condição encontrada neste estudo e não cada dosimetria ou concentração do corante avaliado. O mesmo raciocínio foi extrapolado para as amostras viáveis, em que a TFD não foi efetiva. A Figura 5 (A) representa as condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz) em que houve a formação de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri. Por sua vez, a figura 5 (B) representa a condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz) em que houve a efetividade da TFD confirmada por meio da ausência de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri.

As mesmas condições experimentais foram ilustradas por meio da microscopia confocal a laser [Figura 6 (A) e Figura 6 (B)]. A figura 6 (A) mostra o aspecto das colônias do *S. mutans* (ATCC 25175) na cor verde, evidenciando a viabilidade destes microrganismos nas condições experimentais C+L-

(presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz). Neste caso houve a entrada do corante fluorescente nas bactérias devido ao dano causado à membrana plasmática após a TFD. A figura 6 (B) mostra a efetividade da TFD em que as colônias de *S. mutans* apresentam-se com coloração vermelho-alaranjada, o que denota dano ao seu material genético (morte bacteriana). Esse fato é devido à quebra da ligação entre as bases nitrogenadas da dupla fita de DNA após a TFD, fazendo com que elas fiquem livres para a ligação com o corante fluorescente alaranjado de acridina. A utilização do TBO em maiores concentrações (25 e 250 J/cm²), na ausência da iluminação pelo LED (0 J/cm²) promoveu o controle do crescimento bacteriano e indicou ser tóxico à espécie em questão nestas condições. A aplicação isolada da luz LED sem a prévia fotossensibilização das amostras (0 µg/mL) não foi capaz de impedir o crescimento bacteriano (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de *S. mutans* (ATCC 25175)

TBO (µg/mL)	Dosimetrias utilizadas (J/cm ²)				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
2,5	+	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

+ : presença de crescimento bacteriano; - : ausência de crescimento bacteriano.

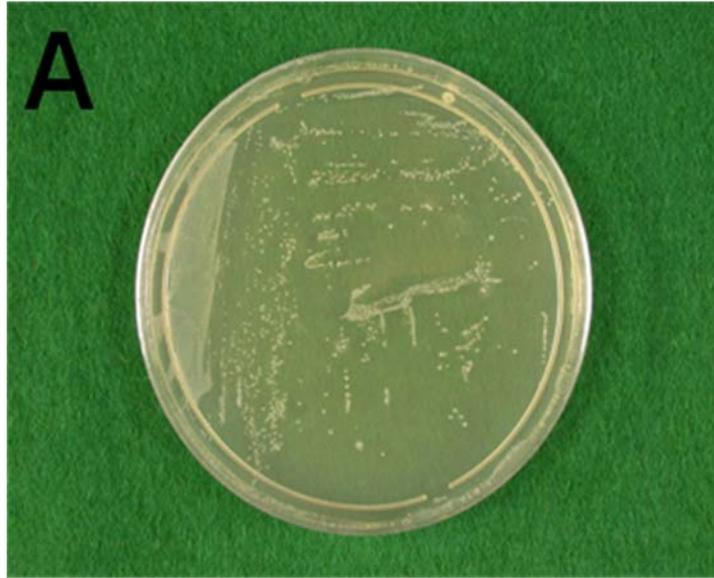


Figura 5 (A) - Crescimento de *S. mutans* ATCC (25175) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz)



Figura 5 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. mutans* ATCC (25175) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz)

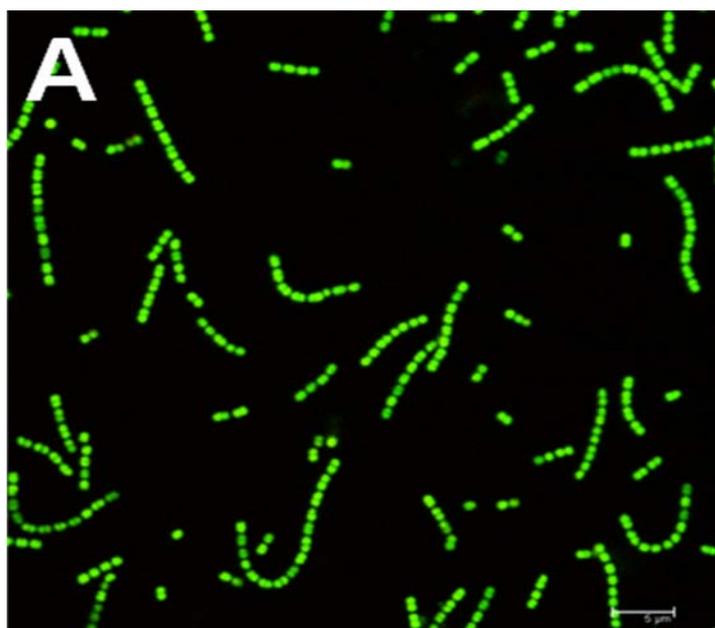


Figura 6 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana de *S. mutans* ATCC (25175) nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz)

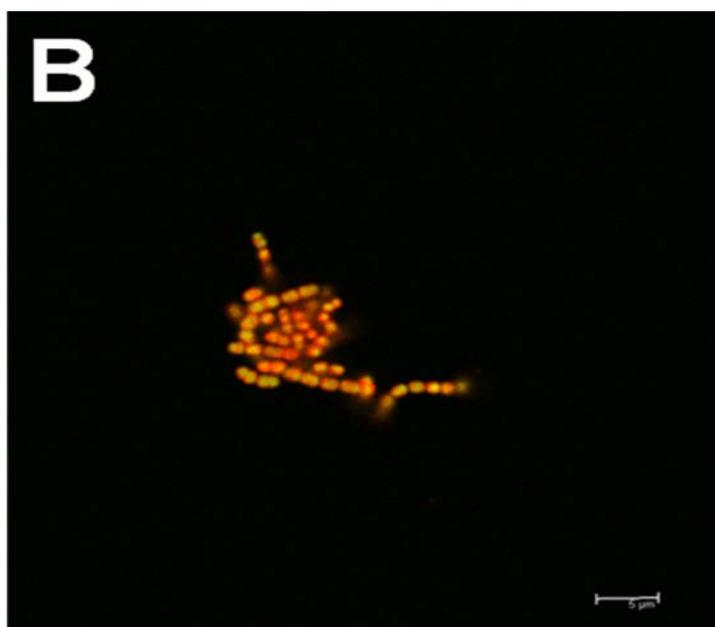


Figura 6 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para a cepa padrão de *S. mutans* ATCC (25175) na condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz)

5.2 AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *S. MUTANS* (43513) E *S. MUTANS* (47513)

Os resultados da aplicação da TFD sobre o isolado clínico de *S. mutans* (43513) nas diferentes dosimetrias e concentrações do corante (TBO) estão descritos na Tabela 3.

Dos resultados alcançados (Tabela 3), foi possível a inibição do crescimento microbiológico da espécie de *S. mutans* (43513) após aplicação da TFD na dosimetria a partir de 12 J/cm² associado à concentração de TBO a 25 µg/mL. Pode-se verificar que nas dosimetrias subseqüentes (24, 36 e 48 J/cm²) o crescimento bacteriano da espécie em questão foi controlado com concentração menor do TBO (2,5 µg/mL). A semeadura e incubação em placas de Petri e a microscopia confocal a laser foram utilizadas de modo a confirmar e ilustrar os achados.

A Figura 6 (A) representa as condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz) em que houve a formação de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri. Por sua vez, a figura 6 (B) representa a condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz) em que houve a efetividade da TFD confirmada por meio da ausência de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri.

As mesmas condições experimentais foram ilustradas por meio da microscopia confocal a laser [Figura 7 (A) e Figura 7 (B)]. A figura 7 (A) mostra o aspecto das colônias do *S. mutans* (43513) na cor verde, evidenciando a viabilidade destes microrganismos nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz). Neste caso houve a entrada do corante fluorescente nas bactérias devido ao dano causado à membrana plasmática após a TFD. A figura 7 (B) mostra a efetividade da TFD em que as colônias de *S. mutans* apresentam-se com coloração vermelho-alaranjada, o que denota dano ao seu material genético

(morte bacteriana). Esse fato é devido à quebra da ligação entre as bases nitrogenadas da dupla fita de DNA após a TFD, fazendo com que elas fiquem livres para a ligação do corante fluorescente alaranjado de acridina. A utilização do TBO em maior concentração (250 J/cm^2), na ausência da iluminação pelo LED (0 J/cm^2) promoveu o controle do crescimento bacteriano e indicou ser tóxico à espécie em questão nestas condições. A aplicação isolada da luz LED sem a prévia fotossensibilização das amostras (0 µg/mL) não foi capaz de impedir o crescimento bacteriano (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de *S. mutans* (43513)

TBO ($\mu\text{g/mL}$)	Dosimetrias utilizadas (J/cm^2)				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
2,5	+	+	-	-	-
25	+	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

+ = presença de crescimento bacteriano; - = ausência de crescimento bacteriano.



Figura 7 (A) - Crescimento do isolado clínico de *S. mutans* (43513) nas condições experimentais A+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), A-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e A-L- (ausência do corante e da fonte de luz)



Figura 7 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) do isolado clínico *S. mutans* (43513) na condição experimental A+L+ (presença do corante e da fonte de luz).

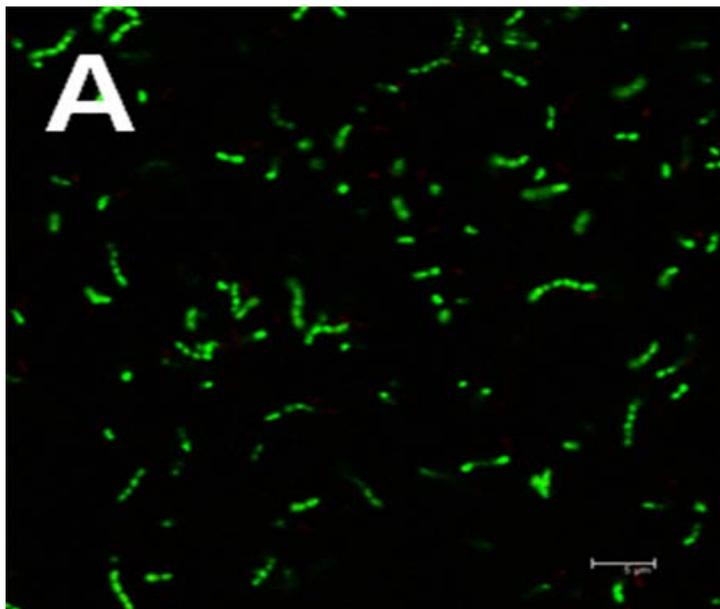


Figura 8 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana para o isolado de *S. mutans* (43513) nas condições experimentais A+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), A-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e A-L- (ausência do corante e da fonte de luz)

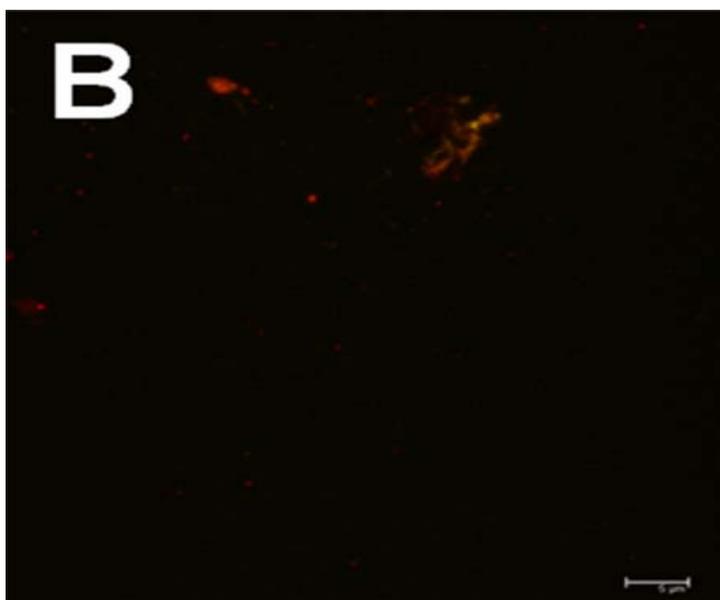


Figura 8 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para o isolado clínico de *S. mutans* (43513) na condição experimental A+L+ (presença do corante e da fonte de luz)

Os resultados da aplicação da TFD sobre o isolado clínico de *S. mutans*

(47513) nas diferentes dosimetrias e concentrações do corante (TBO) estão descritos na Tabela 4.

Dos resultados alcançados (Tabela 4), foi possível a inibição do crescimento microbiológico da espécie de *S. mutans* (47513) após aplicação da TFD na dosimetria a partir de 12 J/cm² associado à concentração de TBO a 2,5 µg/mL, a qual também foi a concentração mínima necessária para o controle do crescimento bacteriano nas dosimetrias subseqüentes (24, 36 e 48 J/cm²). A semeadura e incubação em placas de Petri e a microscopia confocal a laser foram utilizadas de modo a confirmar e ilustrar os achados.

A Figura 9 (A) representa as condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz) em que houve a formação de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri. Por sua vez, a figura 9 (B) representa a condição experimental C+L+ (presença do corante e da fonte de luz) em que houve a efetividade da TFD confirmada por meio da ausência de unidades formadoras de colônia nas placas de Petri.

As mesmas condições experimentais foram ilustradas por meio da microscopia confocal a laser [Figura 10 (A) e Figura 10 (B)]. A figura 10 (A) mostra o aspecto das colônias do *S. mutans* (ATCC 25175) na cor verde, evidenciando a viabilidade destes microrganismos nas condições experimentais C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), C-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e C-L- (ausência do corante e da fonte de luz). Neste caso houve a entrada do corante fluorescente nas bactérias devido ao dano causado à membrana plasmática após a TFD. A figura 10 (B) mostra a efetividade da TFD em que as colônias de *S. mutans* apresentam-se com coloração vermelho-alaranjada, o que denota dano ao seu material genético (morte bacteriana). Esse fato é devido à quebra da ligação entre as bases nitrogenadas da dupla fita de DNA após a TFD, fazendo com que elas fiquem livres para a ligação do corante fluorescente alaranjado de acridina. A utilização do TBO em maiores concentrações (25 e 250 J/cm²), na ausência da iluminação pelo LED (0 J/cm²) promoveu o controle do crescimento bacteriano e indicou ser tóxico à espécie em questão nestas

condições. A aplicação isolada da luz LED sem a prévia fotossensibilização das amostras (0 µg/mL) não foi capaz de impedir o crescimento bacteriano (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da terapia fotodinâmica nas diferentes concentrações de TBO e dosimetrias da luz LED sobre o crescimento de *S. mutans* (47513)

TBO (µg/mL)	Dosimetrias utilizadas (J/cm ²)				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
2,5	+	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

+ = presença de crescimento bacteriano; - = ausência de crescimento bacteriano.



Figura 9 (A) - Crescimento do isolado clínico de *S. mutans* (47513) nas condições experimentais A+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), A-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e A-L- (ausência do corante e da fonte de luz)



Figura 9 (B) - Ausência de unidades formadoras de colônia (UFC) do isolado clínico *S. mutans* (47513) na condição experimental A+L+ (presença do corante e da fonte de luz)

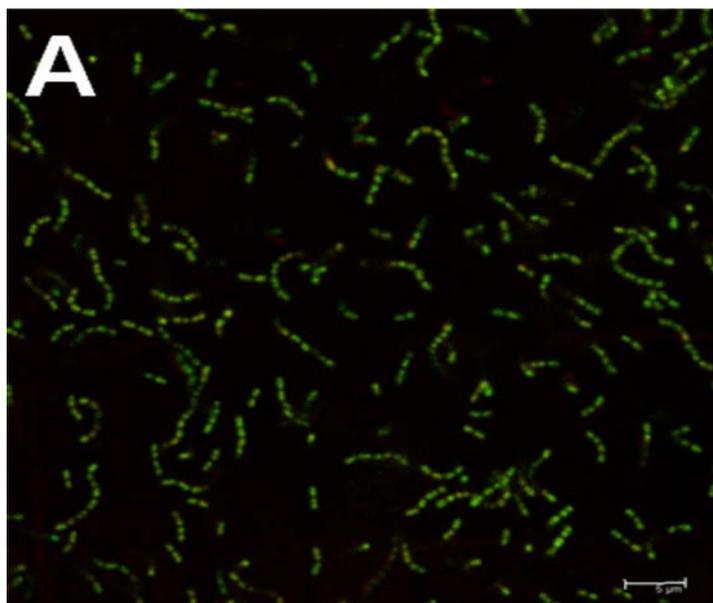


Figura 10 (A) - Microscopia confocal a laser evidenciando a viabilidade bacteriana para o isolado de *S. mutans* (47513) nas condições experimentais A+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz), A-L+ (ausência do corante e presença da fonte de luz) e A-L- (ausência do corante e da fonte de luz)

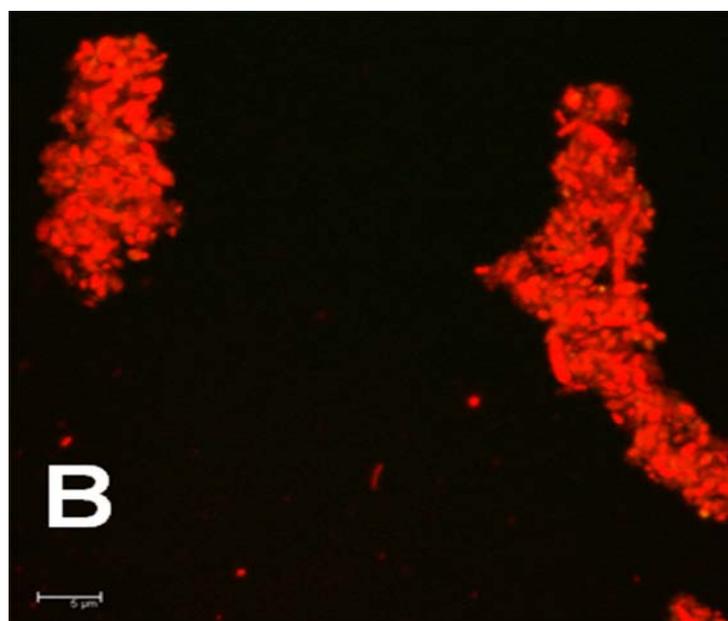


Figura 10 (B) - Microscopia confocal a laser evidenciando a efetividade da terapia fotodinâmica para o isolado clínico de *S. mutans* (47513) na condição experimental A+L+ (presença do corante e da fonte de luz)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS INERENTES AO MÉTODO EMPREGADO

A auto-medicação e o consumo desenfreado de vários tipos de antibióticos fizeram com que, nas últimas décadas, a resistência bacteriana se tornasse um dos maiores problemas de saúde pública (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Diante deste quadro, o estudo e a implementação de novas tecnologias para o tratamento das infecções e das doenças bacterianas tornam-se de vital importância. Sendo assim, a terapia que associa fontes de luz com (FS) e/ou corantes, denominada de terapia fotodinâmica (TFD), tem sido proposta como um tratamento alternativo para a erradicação de vários tipos de microrganismos patogênicos. Na área odontológica, essa alternativa é de extrema valia para ao tratamento de doenças bucais, principalmente aquelas mediadas por acúmulo de biofilme dentário, em que a cárie é a sua maior representante (GAD et al., 2004; ZEINA et al., 2002; GIUSTI et al., 2008).

Investigações *in vitro* têm demonstrado a susceptibilidade de bactérias (BURNS; WILSON; PEARSON, 1994; WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992; PAULINO et al., 2005; ZANIN et al., 2005) e fungos (CARTLEDGE; MIDGLEY; GAZZARD, 1999; ZEINA et al., 2001; DOVIGO, 2005) a essa terapia. A aplicação da TFD como modalidade terapêutica para o tratamento de infecções ainda está em desenvolvimento. Embora sejam encontrados estudos que comprovem a utilização da luz associada a corantes como um procedimento efetivo para inativação microbiológica, algumas variáveis ainda influenciam esse tratamento, como o tipo e a concentração do corante, a espécie do microrganismo, o período de pré-irradiação, a fonte de luz e a dose empregada (JORI et al., 2006). O conhecimento da contribuição desses fatores para o sucesso da TFD antimicrobiana tem sido alvo de estudos que buscam tornar essa prática uma alternativa viável para o controle de infecções.

No presente trabalho, diodos emissores de luz (LED's) no comprimento de onda vermelho e o corante azul de orto-toluidina (TBO) foram utilizados em

diferentes dosimetrias e concentrações com o intuito de avaliar seus efeitos sobre dois tipos de cepas de *S. mutans*. Essa associação também foi utilizada em outros trabalhos, cujos resultados foram satisfatórios (WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992; DOBSON; WILSON, 1992; ZANIN et al., 2005).

Espécies de *S. mutans* (ATCC 25175) e dois isolados clínicos de *S. mutans* (43513 e 47513) foram avaliados quanto à capacidade de crescimento de) após a utilização da TFD, levando-se em conta a associação de quatro concentrações diferentes de azul de orto-toluidina (TBO) e quatro dosimetrias do LED no comprimento de onda vermelho (Tabelas de 2 a 4).

O efeito antimicrobiano da TFD tem sido descrito como resultado da interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto químico não tóxico (corante ou FS) e oxigênio, o que promove a formação de espécies reativas capazes de induzir o controle do crescimento microbiológico. O mecanismo da fotossensibilização tem início quando as moléculas do FS ou corante são irradiadas com luz visível e os fótons são absorvidos por estes. Com isso, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singleto (elétrons de spins emparelhados). Esse elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado tripleto (spins paralelos). O corante no estado tripleto possui um tempo de vida relativamente longo, o que permite um aumento do número de colisões, ainda em estado excitado, com outras moléculas (por exemplo, com o oxigênio). Essa interação com moléculas vizinhas pode ocorrer por meio de dois principais mecanismos. Os produtos da reação tipo I são radicais livres que podem gerar vários produtos oxidados. Entretanto, são as reações do mecanismo tipo II as principais envolvidas no processo de controle bacteriano. O corante no estado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), produzindo o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), voltando ao seu estado fundamental. A espécie $^1\text{O}_2$ é altamente reativa no sistema biológico e pode interagir com proteínas e lipídeos promovendo o controle de crescimento bacteriano (DOVIGO, 2007; PERUSSI, 2007). Portanto, a aplicação de luz sem a presença de um corante (condição experimental C-L+) não é capaz de promover a formação do oxigênio singleto, sendo fundamental a presença de uma substância para intermediar o processo

de formação dos radicais. Os resultados observados pela análise das Tabelas de 2 a 4 e as figuras 5 (A), 7 (A) e 9 (A) confirmam essa teoria.

O corante escolhido para o estudo é um composto fenotiazínico de cor azul com absorção máxima na região do vermelho visível (630nm). Sua composição é formada por uma estrutura tricíclica simples, sendo que seu tamanho e forma simples, o torna ideal para intercalação com ácidos nucleicos. Esse composto é normalmente comercializado na forma de sais com o cromóforo do corante sendo catiônico. Em solução o corante é hidrofílico, porém em sistemas biológicos, o TBO é parcialmente convertido a sua forma neutra devido à desprotonação. Ele apresenta a propriedade de alterar a membrana citoplasmática bacteriana ligando-se aos polifosfatos presentes na camada externa desta membrana e possui potencial altamente hidrofóbico, o que facilita ainda mais sua ligação à camada lipídica. Esta propriedade aliada ao seu coeficiente de permeabilidade devido ao seu potencial catiônico faz com que ele se torne altamente concentrado no interior da bactéria aumentando seu poder destrutivo. Ainda mais, tem um alto potencial de formação de espécies de dímeros, os quais são responsáveis pelo mecanismo e efetividade fotodestrutiva (HACHISAKO et al., 1994; ITO, 1978; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Dessa forma, o corante pode adentrar a bactéria e ocasionar danos irreversíveis a organelas intracelulares, o que leva à inativação bacteriana (BERTOLONI et al., 1989). Segundo Jori et al. (2006), o aumento da permeabilidade da membrana durante os processos fotoquímicos iniciais é fundamental para acentuar o efeito fotodinâmico em bactérias, pois a inativação ocorre efetivamente após a captação do corante para o interior do microrganismo. Tal fato pode ser comprovado pelos resultados de Lambrechts et al., (2005). Segundo esses autores, como a permeabilidade da membrana citoplasmática é maior para moléculas com carga positiva, a utilização de corantes ou FS catiônicos promove a fotoativação de *S. mutans*.

Os estudos utilizam desde baixas ($\mu\text{g/mL}$) a altas (mg/mL) concentrações de TBO (WILSON, 2004; BEVILACQUA et al., 2007; ZANIN; JUNIOR; GONÇALVES, 2002; ZANIN et al., 2005; GIUSTI et al., 2008). A maioria destes trabalhos avaliou a efetividade da TFD sobre biofilmes formados artificialmente. Como as concentrações do corante utilizado devem ser mais

altas, devido diminuição da sensibilidade a terapias antimicrobianas desses biofilmes, optou-se, no presente estudo, em trabalhar com menores concentrações, já que a aplicação da TFD foi realizada sobre suspensões bacterianas. Sendo assim, as seguintes concentrações do corante TBO foram utilizadas: 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL.

Em relação ao tempo de pré-irradiação, as suspensões bacterianas utilizadas no estudo foram incubadas com o TBO durante 2 minutos. Esse período é recomendado para que o corante possa se ligar à camada externa dos microrganismos, fotossensibilizando-os. Não existe um consenso na literatura quanto ao tempo de pré-irradiação necessário para se ter efeito bactericida sobre as suspensões devido, principalmente, a grande variedade de corantes e FS aplicada aos estudos. A grande maioria dos estudos faz uso, para bactérias, de tempos variando de 1 a 5 minutos, o qual tem sido suficiente para fotossensibilizar e inativar espécies de *S. mutans* por completo. Diversos estudos têm apontado para que o aumento do tempo de pré-irradiação de 5 minutos a 1 ou 2 horas não ter nenhum efeito somatório na inativação de microrganismos (WAINWRIGHT, 1998; JORI; BROWN, 2004), salvo exceção de cistos de protozoários e culturas fúngicas (POLO et al, 2000). Segundo Jori et al. (2006), a combinação de curtos períodos de pré-irradiação, baixas concentrações de FS e parâmetros de irradiação consagrados na literatura são necessários para a TFD ser efetiva sobre microrganismos patogênicos.

O corante TBO é um das substâncias mais utilizadas em TFD e apresenta alta efetividade (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Entretanto, seu uso na boca pode ocasionar alteração na cor das superfícies dentárias e de restaurações a base de resina composta (GIUSTI et al., 2008). Além dos corantes, o uso de FS que não possuem propriedades corantes, tem sido utilizado com sucesso na TFD (GIUSTI et al., 2008).

As fontes de radiação empregadas na TFD são, em geral, os lasers de baixa intensidade (MACHADO, 2000). A melhor fonte de irradiação tem sido descrita como sendo a que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos. Os lasers, normalmente, apresentam um elevado custo. Uma alternativa viável são os lasers diodo, os quais cobrem praticamente todo o espectro

visível e infravermelho próximo, podendo assim atender boa parte dos agentes FS já existentes no mercado. Com o emprego de FS de segunda geração, em virtude de sua elevada absorvidade molar, o uso de diodos emissores de luz (LED's) tem também se tornado viável, possibilitando uma maior redução no custo dos procedimentos (MACHADO, 2000). Nos estudos, os autores apresentam achados concordantes quanto a efetividade dos LEDs (GIUSTI et al., 2008; BEVILACQUA et al., 2007) e, ao compararem o fator redução bacteriana com os lasers de baixa intensidade, não encontram diferenças estatisticamente significativas (ZANIN et al., 2005). No presente estudo, foi utilizado o dispositivo denominado "*Bio Table*" a qual foi desenvolvida pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo. Ela é constituída por lâmpadas do tipo LED (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, Califórnia, USA) distribuídas uniformemente no interior do sistema óptico. Sobre as lâmpadas foi acoplada uma placa de vidro difusora para permitir a emissão de luz uniforme em toda a superfície de iluminação do aparelho. A "*Bio Table*" possui potência de saída constante de 400 mW/cm^2 e a luz emitida se encontra numa estreita faixa do espectro fotomagnético, predominantemente em 650 nm, na qual o corante empregado apresenta alta capacidade de absorção de luz. A potência de saída deste dispositivo é um fator importante a ser considerado, pois este valor, juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada. Essa quantidade de energia é denominada fluência ou dosimetria e é expressa pela energia por área (J/cm^2). Este protótipo foi usado por alguns estudos e demonstrou efetivo potencial na redução microbiológica de diferentes patógenos (GIUSTI, 2005; DOVIGO, 2007).

Foram selecionadas culturas de *S. mutans* para este trabalho, já que é sabido que tais microrganismos estão envolvidos no processo de desenvolvimento da cárie dentária (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Sendo assim, foram utilizadas para a realização da parte experimental, uma cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) de modo a servir como parâmetro de comparação, após a TFD, com os dois isolados clínicos de *S. mutans* (43513 e 47513) os quais são oriundos de um ambiente em que houve troca de material genético

entre as espécies e estiveram propensos aos desafios do meio bucal, podendo apresentar um comportamento mais resistente frente à terapia (TEN CATE, 2006). A utilização dessas suspensões pode não simular fielmente as condições encontradas *in vivo*, já que, clinicamente, os microrganismos encontram-se agrupados em comunidades complexas denominadas biofilmes microbianos (CHANDRA et al., 2001; ZANIN et al., 2005). Segundo alguns pesquisadores a sensibilidade de microrganismos a diferentes tipos de tratamento diminui consideravelmente quando são avaliados nesta forma (CHANDRA et al., 2001; TEN CATE, 2006). Contudo, foi demonstrado por Giusti et al. (2008) uma redução significativa na atividade metabólica de biofilmes de *S. mutans* após fotossensibilização com 0,1 mg/mL de TBO e iluminação com LED's no comprimento de onda vermelho a 48 J/cm². Dessa forma, a utilização da TFD, *in vivo*, aponta para um campo de estudo promissor.

Na presente pesquisa, os resultados obtidos foram submetidos à incubação e semeadura e placas de Petri e, para comprovar essas observações, foi utilizada a microscopia confocal a laser. Metodologia similar foi também utilizada em outros estudos (WOOD, 1999; SOUKOS et al., 2003; ZANIN et al., 2006).

6.2 ASPECTOS INERENTES AOS RESULTADOS ALCANÇADOS

Os resultados alcançados no presente estudo *in vitro* advêm das diversas combinações possíveis de corante e fonte de luz, da iluminação isolada do LED, da aplicação isolada do TBO e da susceptibilidade das espécies de *S. mutans* à TFD.

No presente estudo, não foi observado crescimento bacteriano em determinadas condições experimentais. Para a condição C+L+ (presença do

corante e da fonte de luz), a associação de duas concentrações de TBO (25 e 250 µg/mL) e irradiação LED por 30s (12 J/cm²) impediu o crescimento das espécies bacterianas de *S. mutans* estudadas. Quando a densidade de energia foi aumentada, as espécies apresentaram comportamentos distintos. A susceptibilidade da espécie de *S. mutans* (ATCC 25175) e do isolado de *S. mutans* (43513) à TFD foram semelhantes nas densidades de energia de 24, 36 e 48 J/cm². Nessas situações, quando a densidade de energia foi aumentada de 12 J/cm² para 24 J/cm², observou-se uma inibição do crescimento bacteriano utilizando-se uma menor concentração do corante (2,5 µg/mL). Neste caso, pode-se presumir que houve uma maior produção de oxigênio singlete, fazendo com que houvesse uma maior chance de destruição de organelas intracelulares, levando a morte bacteriana. Para as dosimetrias subsequentes (36 e 48 J/cm²), o aumento dos tempos de exposição do conjunto à fonte de luz demonstrou não existir efeito adicional, já que ainda manteve-se o mesmo comportamento à mesma concentração de TBO (2,5 µg/mL). Sendo assim, o LED pode ter efeito limitado, já que o aumento da dose de energia luminosa apresenta um limite de ação após máxima inibição que ele consegue atingir para aquela dose. Neste caso, a inviabilidade bacteriana pode ter atingido a constante de morte na curva logarítmica, em que, por mais que se aumente a densidade de energia, não haverá efeito adicional na inviabilidade total bacteriana.

O isolado clínico de *S. mutans* (47513) apresentou comportamento distinto quando submetido a essa mesma condição experimental (A+L+). Neste caso, o isolado quando submetido às dosimetrias estudadas (12, 24, 36 e 48 J/cm²) associado à concentração de TBO a 2,5 µg/mL não apresentou uma resistência à terapia logo no início, como foi observado para a dose de 12 J/cm² para as outras duas espécies. Nesta situação apresentou inviabilidade bacteriana, mantendo-se este mesmo comportamento até a última dosimetria estudada. O que se pode prever é que esse isolado clínico, mesmo constituindo-se uma cultura selvagem, com todos seus mecanismos de defesa e troca de material genético, pode apresentar uma maior sensibilidade à terapia, já que há diferentes tipos de *S. mutans* catalogados com diversos genótipos (TEN CATE, 2006).

Quando o TBO foi utilizado em uma menor concentração (0,25 µg/mL) associado às densidades de energia estudadas, foi observado um comportamento semelhante para os três tipos de *S. mutans*. Para essa situação, foi notada viabilidade bacteriana, por mais que se aumentasse o tempo de exposição à fonte de luz LED. Essa situação pode ser explicada pela utilização de uma concentração mínima do corante, o que pode ter interferido diretamente sobre a produção de óxidos reativos e, conseqüentemente, sobre a inviabilização bacteriana.

Os dados obtidos dentro da condição experimental C+L+ demonstraram que a inativação dos microrganismos avaliados foi conseguida às custas da associação da fonte de luz LED e das diferentes concentrações de TBO para as três espécies estudadas. No presente estudo, o aumento das concentrações de TBO e das dosimetrias do LED sugerem ter influência nos resultados da TFD. Contudo, esse efeito não pode ser evidenciado de forma clara, já que os resultados foram baseados em presença de inibição (-) ou viabilidade bacteriana (+). É válido lembrar que foram utilizados intervalos em que se concentrou o corante em 10 vezes. Sendo assim, não foi possível afirmar categoricamente que a concentração que inviabilizou o crescimento bacteriano é a única a gerar a morte bacteriana, já que em concentração menor ou próxima daquela que não atingiu a inviabilidade, possa ter um efeito destrutivo às espécies. Contudo, nessas concentrações intermediárias pode ter existido inibição parcial dessas espécies, o que, para o controle de doenças infecciosas como a cárie dentária, é de grande relevância, já que pode diminuir a virulência dessas espécies (TEN CATE, 2006). De forma semelhante aos resultados encontrados, outros estudos também observaram que a concentração do corante e a dose de luz interferem na efetividade da fotossensibilização de *S. mutans* por corantes fenotiazínicos (GIUSTI et al., 2008; ZANIN et al., 2005). Usacheva, Teichert e Biel (2001) observaram que o grau de dano fotodinâmico foi dependente da concentração do corante (TBO), da intensidade e da dosimetria da fonte de luz.

O controle do crescimento das espécies de *S. mutans* por meio da TFD pode apresentar importantes vantagens em relação aos tratamentos convencionais como o controle químico (bochechos com clorexidina) e o

mecânico (remoção do tecido cariado). O que tem se demonstrado é que a terapia convencional mecânica, além de utilizar tecido dentário sadio como forma de acesso a cavidade para eliminar completamente a lesão de cárie, nem sempre essa eliminação é de toda satisfatória devido às recidivas de cárie (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995; TSAI et al., 2004). Além disso, a terapia que faz uso da clorexidina, a longo prazo, pode gerar desconforto ao paciente, trazendo-lhe diferentes sintomatologias (HILDEBRANDT, 1992). Sendo assim, a atuação odontológica nesse caso não deve basear-se apenas na cura ou eliminação do sítio infectado, mas na conscientização do paciente em realizar um controle adequado do biofilme dentário, o que, no campo odontopediátrico, é de singular dificuldade devido à imatura coordenação motora e a falta de supervisão dos responsáveis. Portanto, bactérias provenientes de biofilmes dentários podem ser inativadas em condições *in vitro*.

A inativação microbiana também foi conseguida quando da utilização isolada do corante TBO em duas concentrações distintas (25 e 250 µg/mL) para as três espécies, situação denominada C+L- (presença do corante e ausência da fonte de luz LED). Isso pode ser devido ao aspecto tóxico em altas concentrações quando em contato com as espécies estudadas (Tabelas 2, 3 e 4). A cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) apresentou uma maior sensibilidade ao contato isolado do TBO, já que esta cultura é tida como pura, não apresentando os mecanismos de resistência adquiridos pelos isolados clínicos (TEN CATE, 2006).

Achado obtido no estudo, foi que a aplicação isolada da fonte de luz LED (0 J/cm²) não surtiu efeito no crescimento bacteriano sobre as culturas de *S. mutans* estudadas. Nesta situação (C-L+) por mais que se aumentassem as dosimetrias, não se atingiu a controle do crescimento bacteriano. Sendo assim, o mecanismo (PERUSSI, 2007; MACHADO, 2000) de que para existir inviabilidade bacteriana é necessária a intermediação de uma substância corante ou FS para prover a formação das ROS (formas de oxigênio altamente reativo), os quais são utilizados metabolicamente pelas bactérias, levando à própria morte bacteriana, foi provada pela presente pesquisa.

Neste estudo, os resultados indicaram que a TFD representa uma alternativa promissora e viável para o tratamento e prevenção da cárie dentária

in vitro. O que se pretendeu foi delimitar alguns parâmetros para guiar futuros estudos *in vitro* com outros corantes e FS, já que a extrapolação para estudos *in vivo* deve ser abordada com cautela. Alguns aspectos dessa modalidade ainda precisam ser esclarecidos, como a influência da saliva na terapia, o estudo da efetividade de outros FS e corantes e os efeitos citotóxicos dessa terapia sobre os tecidos adjacentes.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que:

1. A utilização da terapia fotodinâmica com LED's associada ao corante TBO foi efetiva na inativação da cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e dos dois isolados clínicos (43513 e 47513);
2. A viabilidade/inviabilidade dos microrganismos foi dependente da concentração do TBO e dosimetria aplicada;
3. A combinação de 2,5 µg/mL do TBO (concentração mínima) com iluminação a 24 J/cm² (dosimetria mínima) dos LED's foi efetiva no controle *in vitro* das três espécies de *S. mutans* estudadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Alaluusua S, Renkonen OV. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand J Dent Res. 1983; 91(6): 453-457.
- Alaluusua, S. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol. 1996; 41(2): 167-73.
- Almeida, BS, Bastos, JRM. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. Rev Gau Odontol. 2001;49(3):133-138.
- Axelsson P, Lindhe J, Wäseby J. The effect of various plaque control measures on gingivitis and caries in schoolchildren. Community Dent Oral Epidemiol. 1976;4(6):232-9.
- Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. The early establishment of Streptococcus mutans in the mouths of infants. Arch Oral Biol. 1975; 20(3); 171-174.
- Berkowitz RJ, Turner J, Green P. Maternal salivary levels of Streptococcus mutans and primary oral infection of infants. Arch Oral Biol. 1981;26(2):147-9.
- Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1989;135: 957-66.
- Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri M, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of Streptococcus mutans in a planktonic culture. Photomed Laser Surg. 2007; 25(6); 513-518.
- Biel MA. Photodynamic therapy in head and neck cancer. Curr Oncol Rep. 2002;4(1):87-96.
- Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium?. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):126-31.
- Bretz WA. Early detection of mutans streptococci in infants. J Dent Res. 2003; 82(Sp. Issue B); Abs 2739.
- Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. J Dent Res. 1998;77(3):445-52.
- Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photossensitization of streptococcus mutans. Caries Res. 1995; 29(3):192-197.

Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol.* 1993; 38(6):401-5.

Burns T, Wilson, M, Pearson GJ. Killing of bacteria by light from a gallium aluminium diode laser. *J Dent.* 1994; 22(5):932-940.

Carlsson J. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1970; 15(12):1143-48.

Carranza FA, Newman MG. *Periodontia Clínica.* Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 1997.

Carré V, Jayat C, Granet R, Krausz P, Guilloton M. Chronology of the apoptotic events induced in the K562 cell line by photodynamic treatment with hematoporphyrin and monoglucosylporphyrin. *Photochem Photobiol.* 1999;69(1):55-60.

Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-albicans oral candidosis in HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(3):419-22.

Catalanotto FA, Shklair IL, Keene HJ. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. *J Am Dent Assoc.* 1975;91(3):606-9.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y. The antimicrobial approach to caries management. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1091-5.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183(18):5385-94.

Chaves MM. *Odontologia Social.* 3 ed. Rio de Janeiro: ArtMed, 1986.

Courvalin P. Molecular and epidemiologic aspects of the resistance to antibiotics: example of glycopeptides on enterococci. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1996;190(4):467-469.

Dahl TA, Midden WR, Neckers DC. Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 1988;48(5):607-12.

Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(6):453-60.

Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2005; 49(6):2329-35.

Dovigo L. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida* spp [dissertação]. Araraquara (SP): Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2007.

Farge P. Recent findings in the etiopathogenesis of caries]. *Arch Pediatr*. 1998;5(10):1140-4.

Fejerskov O, Kidd E. Carie dentária: a doença e seu tratamento clínico. In:_____. 5ª ed. São Paulo. Ed. Santos, 2005. cap.12, p.179-88.

Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2 year-old children in Japan. *Community Dent Oral Health Epidemiol*. 1991;19(3);151-154.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2173-78.

Gibbons RJ, Nygaard, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Arch Oral Biol*. 1968; 13(10):1249-62.

Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomedicine Laser Surgery*. 2008;26(4):281-7.

Giusti JSM. Avaliação da terapia fotodinâmica utilizando diodo emissor de luz (LED) na descontaminação de dentina bovina artificialmente cariada [tese]. Araraquara (SP): Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2005.

Hachisako H, Yamazaki T, Ihara, H, Hirayama C, Yamada K. Recognition of molecular planarity of cationic dyes by anionic, crystalline bilayer aggregates. Evidence using metachromatic and solvatochromic properties. *J Chem Soc*. 1994;2(30):1681-90.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980;44(2):331-84.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious diseases?. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436-450.

Henderson B, Wilson M. Commensal commensalism and the oral cavity. *J Dent Res*. 1998; 77:1674-1683.

Hildebrandt GH, Pape HR Jr, Syed SA, Gregory WA, Friedman M. Effect of slow-release chlorhexidine mouthguards on the levels of selected salivary bacteria. *Caries Res* 1992; 26: 268-74.

Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol*. 2000;1:212-9.

Hotz P, Guggenheim B. Biochemical investigations on pooled human dental plaque. *Caries Res*. 1972;6(1):78.

Ito, T. Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: the 1^o hypothesis as a driving force in recent research. *Photochem Photobiol*. 1978; 28(4-5):493-508.

Jorgensen MG, Slots J. Responsible use of antimicrobials in periodontics. *J Calif Dent Assoc*. 2000;28(3):185-93.

Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(5):403-405.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):468-81.

Keyes, PH. Recent advances in dental caries research. *Bacteriol Int Dent J*. 1962;12:443-63.

Köhler B, Bratthall D, Krasse B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Arch Oral Biol*. 1983;28(3):225-31.

Köhler B, Bratthall D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *Scand J Dent Res*. 1978;86(1):35-42.

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*. 1993;175(11):3247-52.

Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci*. 2002; 17(2):86-92.

Kononen E. Development of oral bacteria flora in young children. *Ann Med*. 2000; 32(2):107-112.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707.

Krasse B. Biological factors as indicators of future caries. *Int Dent J*. 1988;38(4):219-25.

Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci*. 2005;4(7):503-9.

Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*. 2005 Jan;7(1):95-107.

Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154(11):3247-55.

Li YH, Chen YY, Burne RA. Regulation of urease gene expression by *Streptococcus salivarius* growing in biofilms. *Environ Microbiol*. 2000;2(2):169-77.

Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(4):727-52.

Loesche WJ. Role of streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.

Lopez L, Berkowitz R, Spierkerman C, Weisntein P. Topical antimicrobial therapy in the prevention of early childhood caries: a follow-up report. *Pediatr Dent*. 2002; 24(3): 204-206.

Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*. 2000;23(2):237-243.

Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34-39.

Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. *Antimicrob Agents Chemoter* 2005, 49 (4), 1542-52.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 14(3):262-6.

Manji F, Fejerskov O, Nagelkerke NJ, Baelum V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991;19(6):324-8.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):176-85.

Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am*. 1999;43(4):599-614.

- Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol.* 1979;10(4):497-502.
- Matthijs S, Adriaems PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol* 2002; 29; 1-8.
- Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of streptococcus mutans biofilms by light fractionation. *J Antimicrobial Chemoter.* 2006; 58:190-2.
- Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol*, 1998; 1:88-95.
- Nauta JM, Vanleengoed HLLM, Star WM, Roodenburg JLN, Witjes MIH, Vermey Y YA. Photodynamic therapy of oral cancer-a review of basis mechanisms and clinical applications. *Eur J Oral Sci.*1996; 104(2): 69-81.
- Newbrun E, Huber R, Tenebaum G, Sela MN, Sgan-Cohen HD. The effect of previous diet on plaque pH response to different foods. *J Dent Res.* 1988;67(11):1434-7.
- Newman HN, Wilson M. Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease, BioLine, Cardiff, 1999.
- Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei GJR, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(3):353-9.
- Pereira, AC. Odontologia em saúde coletiva: planejando ações e promovendo saúde. 1 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003.
- Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova.* 2007; 30(4):988-94.
- Piovano S, Marcantoni M, Dono R, Bellagamba H. Effect of a chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* in saliva. *Acta Odontol Latinoam.* 2005; 18: 7-13.
- Polo L, Segalla A, Bertoloni G, Jori G, Schaffner K, Reddi E. Polylysine porphycene conjugates as efficient photosensitisers for the inactivation of microbial pathogens. *J PhotochemPhotobiol B: Biol.* 2000;59(1-3):152–158.
- Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrobial Agents Chemoter.* 1999;43(7):1595-9.

Quirynen M, Teughels W, De Soete M, Van Steenberghe. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol* 2000; 28(1):72-90.

RAAB O. *Z Biol*, 1900, 39, 524.

Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J.. Bacterial colonization during de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003;30(11):990-5.

Rosa OPS, Rocha RSS. Clorexidina e a cárie dentária. *Cecade News*. 1993; 1: 1-24.

Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3364-7.

Samaranayake LP, Sedgley CM, Chu CS, Lo EC,. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in semi-recluse human vegetarians. *Arch Oral Biol*. 1996 Mar;41(3):307-9.

Schuster GS. Oral flora and pathogenic organisms. *Infect Dis Clin Clin North Am*, 1999;13:757-74.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J..The effect of a chlorhexidine regimen on plaque formation. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 609-14.

Sharman WM, Allen CM, Van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basis principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 1999; 4(11):507-17.

Simionato MR, Imparato JC, Oda M, Pinheiro SL. Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent*. 2005 Aug;18(4):261-6.

Smith VH, Pippin DJ. Implications of resource-ratio theory for oral microbial ecology. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(2 Pt 1):605-15.

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003;33(3):161-8.

Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(3):253-9.

Spratt DA, Pratten J. Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(1):45-9.

Suchett-Kaye G, Morrier JJ, Barsotti O. Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease. *Res Microbiol.* 2001;52(7):631-9.

Ten Cate J. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 2006; 94(1):1-9.

Thorild I, Lindau-Jonson B, Twetman S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and in their preschool children. *Int J Paediatr Dent.* 2002;12(1):2-7.

Tsai JC, Chiang CP., Chen HM, Huang SB, Wang CW, Lee MI, Hsu YC et al. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5 aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg. Med.* 2004; 34(1): 18-24.

Twetman S, Petersson LG. Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res.* 1998;32(2):113-8.

Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* 2004;38(3):223-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2):165-173.

Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG Jr, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1996;41(3):291-8.

Van der Hoeven JS, Camp PJ. The use of lectins in monitoring degradation of oligosaccharide chains in mucin by oral streptococci. *Caries Res.* 1994;28(4):257-61.

Wainwright M. Pathogen inactivation in blood products. *Curr Med Chem.* 2002;9(1):127-43.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemoter.* 1998; 42(1):13-28.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue o on streptococcus mutans. *Caries Res.* 2003; 37(3):190-3.

Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of streptococcus sanguis in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrobial Chemoter.* 1996; 37(2):377-82.

- Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992;25(2):77-81.
- Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(3):182-7.
- Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog.* 2001; 84(3); 235-254.
- Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy on oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):412-418.
- Wilson M. Use of constant depth film fermentor in studies of biofilms of oral bacteria. In *Methods of Enzymology* (Doyle, RJ Ed), pp. 264-279. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1999.
- Wood S, Metcalf D, Robinson C, Devine D. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrobial Chemoter.* 2006;57:680-4.
- Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J et al. *J Photochem Photobiol.* 1999; 50(1):1-7.
- Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64-9.
- Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrobial Chemoter.* 2005; 56(2):324-30.
- Zanin ICJ, Junior AB, Gonçalves RB. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2002; 56(supl):7-11.
- Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 2002; 146(4): 568-73.
- Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001;144(2):274-8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Cálculos realizados para a obtenção dos tempos de iluminação das amostras de *S. mutans*

A dose de luz (J/cm^2) é calculada por meio de uma fórmula, na qual o seu valor é diretamente proporcional à intensidade de luz do aparelho (W/cm^2) e ao tempo de iluminação (segundos):

$$\text{Dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = I (\text{W}/\text{cm}^2) \times T (\text{s})$$

É importante ressaltar que a intensidade de luz é obtida por meio da multiplicação da potência de saída do aparelho (W) pela área de iluminação (cm^2).

Este valor é fixo e foi fornecido pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) juntamente com as instruções para utilização da “*Bio Table*”. Como na maioria das fontes de luz, o valor da intensidade foi fornecido na unidade mW, ou seja, Watts divididos por mil. Portanto, para inserir esse valor na fórmula, foi preciso fazer a transformação de unidades. Dessa forma, o valor da intensidade de $400 \text{ mW}/\text{cm}^2$ foi convertido para $0,4 \text{ W}/\text{cm}^2$.

- Cálculo do tempo de iluminação para a dosimetria de $12 \text{ J}/\text{cm}^2$:

$$\text{Dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = I (\text{W}/\text{cm}^2) \times T (\text{s})$$

$$12 \text{ J}/\text{cm}^2 = 0,4 \text{ W}/\text{cm}^2 \times T$$

$$T = 12 \text{ J}/\text{cm}^2 / 0,4 \text{ W}/\text{cm}^2$$

$$T = 30 \text{ segundos}$$

- Cálculo do tempo de iluminação para a dosimetria de $24 \text{ J}/\text{cm}^2$:

$$\text{Dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = I (\text{W}/\text{cm}^2) \times T (\text{s})$$

$$24 \text{ J}/\text{cm}^2 = 0,4 \text{ W}/\text{cm}^2 \times T$$

$$T = 24 \text{ J}/\text{cm}^2 / 0,4 \text{ W}/\text{cm}^2$$

$$T = 60 \text{ s ou } 1 \text{ minuto}$$

- Cálculo do tempo de iluminação para a dosimetria de 36 J/cm²:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times T \text{ (s)}$$

$$36 \text{ J/cm}^2 = 0,4 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 36 \text{ J/cm}^2 / 0,4 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 90 \text{ s ou } 1 \text{ minuto e } 30 \text{ segundos}$$

- Cálculo do tempo de iluminação para a dosimetria de 48 J/cm²:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times T \text{ (s)}$$

$$48 \text{ J/cm}^2 = 0,4 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 48 \text{ J/cm}^2 / 0,4 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 120 \text{ s ou } 2 \text{ minutos}$$

APÊNDICE 2

Tabela 1 - Condições experimentais avaliadas para cada microrganismo exposto a terapia fotodinâmica

Condições experimentais	Parâmetros da Terapia Fotodinâmica	
	Dosimetria (J/cm ²)	Concentração do TBO (µg/mL)
1 C-L-	-	-
2 C-L+	12	-
3 C-L+	24	-
4 C-L+	36	-
5 C-L+	48	-
6 C+L-	-	0,25
7 C+L-	-	2,5
8 C+L-	-	25
9 C+L-	-	250
10 C+L+	12	0,25
11 C+L+	12	2,5
12 C+L+	12	25
13 C+L+	12	250
14 C+L+	24	0,25
15 C+L+	24	2,5
16 C+L+	24	25
17 C+L+	24	250
18 C+L+	36	0,25
19 C+L+	36	2,5
20 C+L+	36	25
21 C+L+	36	250
22 C+L+	48	0,25
23 C+L+	48	2,5
24 C+L+	48	25
25 C+L+	48	250

ANEXO

ANEXO



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 032/2008

Bauru, 10 de setembro de 2008.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa "**Avaliação in vitro dos efeitos de fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças**" de autoria de Marco Aurélio Benini Paschoal foi novamente analisado e considerado **APROVADO** em reunião deste Colegiado, realizada no dia 27 de agosto de 2008.

Solicitamos que ao término do trabalho, seja enviado a este Comitê um relatório final para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva