UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLA VECCHIONE GURGEL

*Ação da clorofila como fotossensibilizador e do LED
como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica
antimicrobiana contra o Enterococcus faecalis*

BAURU

2013

CARLA VECCHIONE GURGEL

*Ação da clorofila como fotossensibilizador e do LED
como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica
antimicrobiana contra o Enterococcus faecalis*

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

Versão Corrigida

BAURU

2013

Gurgel, Carla Vecchione
G962aAção da clorofila como fotossensibilizador e do LED
como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica
antimicrobiana contra o Enterococcus faecalis/ Carla
Vecchione Gurgel. - Bauru, 2013.

99 p. : il. ; 31 cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“A única maneira de fazer um excelente trabalho
é amar o que você faz”*

Steve Jobs

*“Desejo que você
Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,
Poís sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.
Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama.”*

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Iordan e Diana...

Vocês são minha fonte de inspiração, minha base de sustentação, meus exemplos de caráter e dignidade. Vocês me deram o mais importante para o meu crescimento e desenvolvimento: AMOR!

O amor é o que nos dá confiança pra seguir em frente, força pra lutar pelos nossos objetivos e segurança pra enfrentar todos os desafios. Vocês são meus exemplos, tanto na vida pessoal como na profissional. Obrigada por me apoiarem em todas as minhas escolhas. Amo vocês!

*E digo-vos que a vida é de facto obscuridade
Excepto onde há arrebatamento,
E todo o arrebatamento é cego excepto onde há saber,
E todo o saber é vão excepto onde há trabalho
E todo o trabalho é vazio excepto onde há amor.
E o que é trabalhar com amor?
É pôr em todas as coisas que fazeis
um sopro do vosso espírito.*

Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado uma família maravilhosa, repleta de muito amor; e saúde pra apreciar os bons momentos da vida e conseguir ultrapassar os obstáculos.

Ao meu marido Anderson, por ter me acompanhado durante toda minha trajetória, desde o mestrado até o doutorado. Agradeço a você pela paciência que sempre teve para entender meus momentos de ausência e de dificuldades. Obrigada por respeitar minhas escolhas e vontades; você me deixou sempre livre pra tomar minhas decisões e sempre estimulou minha busca pelo conhecimento. Sua sensibilidade é a sua característica que mais admiro. Você é um companheiro maravilhoso! Te amo!

*“Porque eu sei que é amor
Eu não peço nada em troca
Porque eu sei que é amor
Eu não peço nenhuma prova*

*Mesmo que você não esteja aqui
O amor está aqui
Agora
Mesmo que você tenha que partir
O amor não há de ir
Embora”
Títãs*

AGRADECIMENTOS COM CARINHO

À minha irmã Laura, pela sua amizade e amor, pela sua determinação e coragem, e por ser minha companheira nesta estrada da vida.

À minha família, pelo apoio e estímulo. Saber que posso contar sempre com vocês me deixa mais segura e tranquila para enfrentar todas as dificuldades.

À minha avó Aldenôra, exemplo de mulher corajosa e forte, que cumpriu sua bela missão de criar filhos e netos de uma maneira tão especial. Vózinha, você não está mais do meu lado, mas com certeza está bem perto do meu coração.

Ao meu abuelo Luís, por me mostrar todos os dias que a vida tem que ser vivida com muita leveza, muita alegria e muita intensidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profª. Cidinha. Admiro a sua capacidade de criar, de querer descobrir novos caminhos dentro da Odontopediatria. Sua mente está sempre fervilhando de ideias brilhantes e inovadoras, sua criatividade é a sua qualidade que mais admiro. Sua visão da vida e do mundo vai além... O caminho que escolhi pode não ter sido o mais certo, as atitudes e decisões que tomei foram muito difíceis, mas saiba que fui em busca de um equilíbrio entre minha vida profissional e pessoal. Agradeço a sua compreensão.

"Inspirar pessoas é o know-how do século XXI. Tenha visão, não alucinação. A compreensão da inspiração cria energia e expande a mente"
RamCharan

À profª. Salete, uma pessoa muito especial que se tornou fundamental no meu aprendizado como aluna. Seriedade e perfeição são as palavras que mais associo à sua conduta profissional. Obrigada por estar sempre presente, disposta a ouvir e ajudar no que for preciso.

Ao prof. José Eduardo, muito obrigada por dividir comigo suas reflexões e seu modo de enxergar a Odontopediatria. Com certeza levarei seus ensinamentos para minha vida profissional.

À profª. Daniela Rios, pela sua dedicação e competência. Os momentos que dividimos juntas, na clínica e no departamento, foram de extremo aprendizado pra mim. Admiro a forma como conduz sua vida profissional.

Ao **prof. Rui**, pela sua amizade. O senhor é um homem de uma integridade e humanidade impressionantes. Obrigado por ter estado do meu lado no momento em que mais precisei, por me aconselhar e entender as minhas dificuldades.

O senhor foi bem mais que um professor pra mim, foi um amigo. Saber que podia contar com o senhor me ajudou a ter forças pra superar todas as adversidades. Agradeço por dividir comigo seus ensinamentos, tanto na vida profissional, como na pessoal. Obrigada por transformar cada tropeço meu em aprendizagem, cada angústia em lição de vida e cada dúvida em oportunidade de amadurecimento.

“Só a experiência própria é capaz de tornar sábio o ser humano.”

Sigmund Freud

*“Me movo como educador porque, primeiro,
me movo como gente.”*

Paulo Freire

AGRADEÇO DE CORAÇÃO...

À prof. Thaís Marchini, por me ensinar a ser uma pesquisadora melhor e, ao mesmo tempo, um ser humano melhor. Obrigada por acreditar em mim e investir na nossa parceria. Trabalhar ao seu lado é um prazer, porque você consegue transmitir seus conhecimentos de uma maneira tão simples, que tudo parece tão fácil. E realmente a vida se torna muito mais fácil quando respeitamos o outro, aceitamos suas limitações e incentivamos suas qualidades.

Com você aprendi a enxergar sempre o lado positivo de tudo, mesmo nos momentos em que parecia não haver saída. Agradeço por você ter me guiado durante o doutorado, pela oportunidade de compartilhar ideias, ideais e ensinamentos. Com certeza não chegaria até aqui sem a sua ajuda e compreensão. Serei eternamente grata a você! Obrigada pela confiança em mim depositada!

*O sábio não se exibe, por isso brilha
Ele não se faz notar, e por isso é notado
Ele não se elogia, e por isso tem mérito
E, porque não está competindo,
ninguém no mundo pode competir com ele*
Lao-Tsé

*"Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

*colo que acolhe, braço que envolve,
palavra que conforta, silêncio que respeita,
alegria que contagia, lágrima que corre,
olhar que acarícia, desejo que sacia,
amor que promove.*

E isso não é coisa de outro mundo,

é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não seja nem curta,

nem longa demais, mas que seja intensa,

verdadeira, pura enquanto durar. "

Cora Coralina

Às funcionárias da Odontopediatria, Dona Lía, Lillian e Estela. Sei que rezaram por mim nos momentos que precisei e ficaram felizes nos meus momentos de alegria. Nunca vou esquecer as palavras de carinho e conforto que recebi de vocês!

"Onde, afinal, é o melhor lugar do mundo?

Meu palpite: dentro de um abraço."

Martha Medeiros

Dona Lia, uma “mãezona” que me acolheu desde o mestrado e que cada vez se tornou mais especial pra mim... Chegar na Odontopediatria e receber seu abraço, era a melhor maneira de começar o dia!

À Lilian, uma pessoa tão especial e sensível, que sempre se mostrou disposta a me ajudar. Obrigada pelo apoio!

À Estela, por ter me acolhido de uma forma tão carinhosa. Nossa convivência foi muito prazerosa!

Ao Alexandre, por se mostrar sempre solícito quando precisei.

Aos funcionários da pós-graduação, pela gentileza com que sempre me trataram e em especial à Fátima, pelo carinho que sempre teve por mim desde o mestrado.

Às funcionárias da Diretoria, Valéria e Graciane, por me receberem de maneira tão cordial e carinhosa sempre! Obrigada meninas pelo apoio que sempre me deram!

"O saber, a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, aprende-se é com a vida e com os humildes."

Buda

AGRADECIMENTO A TODOS AQUELES QUE ME AJUDARAM NESTA PESQUISA

*Ao **Evandro Dionísio**, por ter sido meu companheiro nesta pesquisa. Sua ajuda foi de fundamental importância, sem você este trabalho não seria possível! Juntos, compartilhamos experiências, aprendemos muito e buscamos conhecimento. Você é uma pessoa especial e com certeza terá um futuro brilhante nessa Faculdade. Agradeço a maneira como se dedicou a esta pesquisa. Obrigada de coração!*

*Aos funcionários do laboratório de Farmacologia, por me receberem de forma tão cordial. Agradeço em especial ao **Thiago Dionísio**, por ter colaborado bastante durante os experimentos e pela valiosa contribuição na análise estatística.*

*Aos funcionários do laboratório de Microbiologia, em especial ao **André Luís da Silva**, por ter tido um papel importante na realização desta pesquisa. Obrigada pela dedicação e paciência!*

*Aos funcionários do CIP, em especial ao **Marcelo Lopes**, pela sua ajuda e disponibilidade em colaborar com a pesquisa nos momentos que precisei.*

*Um agradecimento mais que especial ao **Gabriel Barbério**, por ter participado ativamente na realização dos experimentos. Sua ajuda foi de fundamental importância! Quando mais precisei, você estava disposto a colaborar. Você é um aluno brilhante e com certeza terá um futuro profissional de muito sucesso. Meu muito obrigada!*

*À **Daniel Bonné**, pela sua preciosa ajuda na formatação e impressão deste trabalho.*

*À prof.^a **Alessandra Castro Alves**, da Faculdade de Odontologia da UFBA, por sua disponibilidade. Obrigada por compartilhar comigo sua experiência na área de Microbiologia. É bom saber que posso contar com você!*

*À minha querida tia **Rúbia**, pela sua valiosa contribuição e pelo carinho.*

AGRADECIMENTOS COM AFETO

Aos colegas de Doutorado, Adriana, Juliana, Ana Lúcia, Tatiana, Natalino, Suzy, Cileide, Akio e Mariana. Cada um de vocês foi importante de alguma forma no meu aprendizado. Juntos, compartilhamos conhecimento e trocamos experiências.

Agradeço em especial à Ana Lúcia, por ter se tornado mais que uma colega, uma amiga especial que pude compartilhar momentos de felicidade e de dificuldades. Te adoro amiga!

Às alunas de mestrado, e agora de doutorado, Fernanda e Aninha, pelo prazer em conviver com vocês e por poder compartilhar experiências. Sucesso pra vocês!

Aos professores de outras disciplinas que cursei durante o curso de Doutorado, cada um contribuiu de forma marcante no meu aprendizado. Agradeço em especial à Prof. Ana Carolina Magalhães, por ter se mostrado sempre disposta a me ajudar. Admiro a sua competência e sua forma de ensinar!

AGRADECIMENTOS AOS AMIGOS

À Jane e Dona Ofélia, por me acolherem de forma tão cuidadosa e carinhosa. Com vocês eu me sentia em casa!

À Karin, uma amiga mais que especial que fiz aqui em Bauru. Você sempre esteve do meu lado, dividindo minhas alegrias e angústias. Além de ser uma professora brilhante, é uma amiga maravilhosa. Sua companhia fez com que meus dias em Bauru fossem mais divertidos!

Aos amigos Júnior e Carla, que se tornaram tão especiais pra mim aqui em Bauru. A companhia de vocês tornou meu dia-a-dia mais agradável. Obrigada por compartilharem comigo momentos tão prazerosos!

Às amigas Dani e Fá, que fizeram parte da minha história aqui em Bauru, desde o mestrado. Vocês são muito queridas!

À Juliana, que me incentivou a vir estudar em Bauru e que está sempre me motivando a cada dia. Você tem um alto astral contagiante, admiro a leveza com que lida com a vida.

Às minhas amigas de infância, Tati, Kinha, Mari, Rê, Lago e Dí, pela nossa eterna amizade. Saber que posso contar com vocês pra tudo me faz tão bem!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, representada pelo Diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, representada pelo Presidente Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Contú.

*“Se temos de esperar,
que seja para colher a semente boa
que lançamos hoje no solo da vida.
Se for para semear,
então que seja para produzir milhões de sorrisos,
de solidariedade e amizade”.*
Cora Coralina

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) sobre o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *in vitro*, utilizando a clorofila (CL) como agente fotossensibilizador (FS) e o diodo emissor de luz (LED) como fonte de luz. A cultura pura de *E. faecalis* foi ativada em caldo de BHI a 37°C por 24h. O cultivo do microrganismo foi centrifugado a 3000rpm por 15min, e o pellet re-suspenso em 0,85% de solução salina. As concentrações da bactéria foram ajustadas para 10^7 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitro). Diferentes tipos de solventes para a CL foram testados: éter, álcool de cereais, Tween 80 e P-123. 100µl do inóculo e o mesmo volume da solução teste foram inseridos em cada poço da placa de microtitulação. A mistura foi agitada e aguardou-se 1min. 25µl da suspensão foi removida e diluições seriadas foram realizadas. Alíquotas de cada diluição foram espalhadas na superfície da placa, armazenadas em microaerofilia e incubadas na estufa por 24h a 37°C. O número de UFC foi contado em cada placa. Para o experimento da TFDa, os grupos foram divididos em: controle (G1); TBO 1min (G2); CL+Tween 1min (G3); CL+Tween 5min (G4); CL+P-123 1min (G5); CL+P-123 5min (G6); CL+Tween 1min + LED 1min (G7); CL+Tween 1min + LED 5min (G8); CL+Tween 5min + LED 1min (G9); CL+Tween 5min + LED 5min (G10); CL+P-123 1min + LED 1min (G11); CL+P-123 1min + LED 5min (G12); CL+P-123 5min + LED 1min (G13); CL+P-123 5min + LED 5min (G14); TBO 1min + LED 1min (G15); TBO 1min + LED 5min (G16); LED 1min (G17); LED 5min (G18). Um volume de 100µl da suspensão bacteriana foi inserido em poços da placa e o mesmo volume da solução do FS foi adicionado. A CL foi solubilizada em soluções aquosas de Tween ou P-123. Cada poço foi agitado e o tempo de pré-irradiação foi de 1 ou 5min. O LED foi acionado durante 1 ou 5min. 25µl da suspensão foi submetida a diluições seriadas e as alíquotas de cada diluição foram espalhadas na superfície da placa em Ágar BHI. As placas foram armazenadas e colocadas na estufa a 37°C por 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata e as UFC em cada placa foram contadas. As UFC foram transformadas em valores de Log₁₀ UFC para normalizar os dados para análise estatística. A média e o desvio padrão (DP) de cada experimento foram calculados. Os resultados mostraram que o Tween e o P-123 foram os solventes mais eficazes para diluição da CL. A TFDa com utilização da CL diluída em Tween ou P-123 com tempo de pré-irradiação de 5min e com a ação do LED por 5min causou uma pequena diminuição na contagem bacteriana. A CL diluída em Tween com tempo de 1min teve uma redução significativa da contagem bacteriana. O TBO quando associado ao LED durante 1min provocou uma leve redução no número de UFC. A irradiação pelo LED durante 5min foi capaz de causar uma diminuição significativa da quantidade de UFC.

Palavras-chave: Clorofila. *Enterococcus faecalis*. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Fármacos Fotossensibilizantes.

ABSTRACT

Effect of chlorophyll as photosensitizer and LED as an alternative light source on Antimicrobial Photodynamic Therapy against *Enterococcus faecalis*

The aim of this study was to investigate the effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *in vitro*, using chlorophyll (CL) as photosensitizer (FS) agent and light-emitting diode (LED) as light source. Pure culture of *E. faecalis* was cultivated in BHI broth at 37°C for 24h. The culture was centrifuged at 3000rpm for 15min, and the pellets were re-suspended in 0.85% saline solution. The bacterial concentrations were adjusted to 10⁷CFU mL⁻¹ (colony forming units per milliliter). Different types of solvents for CL were tested: ether, grain alcohol, Tween 80 and P-123. 100µl of inoculum and the same volume of the test solution were inserted into each well of the microtitre plate. The mixture was mixed and 1 min was awaited. 25µl of the suspension was removed and serial dilutions were performed. Aliquots of each dilution were spread on the surface of the plates, stored in microaerophilic conditions and incubated for 24h at 37°C. The number CFU was counted in each plate. For aPDT experiment, the groups were divided into: control (G1); TBO 1min (G2); CL+Tween 1min (G3); CL+Tween 5min (G4); CL+P-123 1min (G5); CL+P-123 5min (G6); CL+Tween 1min + LED 1min (G7); CL+Tween 1min + LED 5min (G8); CL+Tween 5min + LED 1min (G9); CL+Tween 5min + LED 5min (G10); CL+P-123 1min + LED 1min (G11); CL+P-123 1min + LED 5min (G12); CL+P-123 5min + LED 1min (G13); CL+P-123 5min + LED 5min (G14); TBO 1min + LED 1min (G15); TBO 1min + LED 5min (G16); LED 1min (G17); LED 5min (G18). A volume of 100µl of bacterial suspension was inserted into the well of microtitre plate and the same volume of FS was added. CL was solubilized in aqueous solution of Tween and P-123. Each well was mixed and pre-irradiation time was 1 or 5min. LED was irradiated during 1 or 5 min. 25µl of suspension was subjected to serial dilutions and aliquots of each dilution were spread on the surface of agar BHI plates. The plates were stored and incubated at 37°C for 24h. Experiments were performed in triplicate and CFU in each plate were counted. The results showed that Tween and P-123 were the most effective solvents for CL dilution. aPDT with diluted CL in Tween or P-123 with pre-irradiation time of 5min and with LED irradiation for 5min caused a small decrease in bacterial count. CL diluted in Tween with 1min time showed a significant reduction in bacterial count. TBO when associated with LED irradiation of 1min caused a slight reduction on CFU number. LED irradiation during 5min caused a significant reduction in CFU count.

Key words: Chlorophyll. *Enterococcus faecalis*. Laser Therapy, Low-Level. Photosensitizing Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Aparelho LED utilizado nos experimentos.....	56
---	----

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação dos resultados da média da contagem das UFC mL ⁻¹ e o DP em cada grupo após transformação de log ₁₀	65
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos do experimento da TFDa.....	59
Tabela 2 - Valores da média de $\log_{10}$ UFC dos grupos, desvio padrão ($\pm$ DP) e intervalo de confiança (IC).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de metileno
BHI	Brain Heart Infusion
C. albicans	Candida Albicans
CL	Clorofila
cmc	Concentração micelar crítica
Cu-Chl	Clorofila de cobre
DP	desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
E. faecalis	Enterococcus faecalis
FS	Fotossensibilizador
h	horas
IC	intervalo de confiança
J/cm ²	joules por centímetro quadrado
J	joules
Laser	amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LED	Diodo emissor de luz
log	logarítimo
mg	miligrama
mg/ml	miligrama por mililitro
min	minuto
MIX	mistura de etanol, glicerol e água
ml	mililitro
mm	milímetro
mTHPC	clorinahidroxifenil tetra
mmol L ⁻¹	milimol por litro
mW	miliwatt
nm	nanômetro
p	valor-p
PEI	Polietilenoimina
pH	potencial hidrogeniônico

Pheid	Feoforbídeo
Pheo	Feofitina
rpm	rotações por minuto
S. aureus	Staphilococcus aureus
seg	segundos
TBO	Azul de Toluidina
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	unidade formadora de colônia
UFC/ml	unidades formadora de colônia por mililitro
Zn-Chl	Clorofila de zinco
Zn-Chld	Clorofilida de Zinco
µg/ml	micrograma por mililitro
µl	microlitro
µM	micro molar
%	porcentagem
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	TERAPIA FOTODINÂMICA	31
2.2	FONTES DE LUZ	37
2.3	FOTOSENSIBILIZADORES	40
2.3.1	Clorofila	45
3	PROPOSIÇÃO	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	MICROORGANISMO	55
4.2	FOTOSENSIBILIZADOR	55
4.3	FONTES DE LUZ	56
4.4	ENSAIOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DA CLOROFILA	56
4.4.1	Ensaio com o solvente éter	57
4.4.2	Ensaio com o solvente álcool de cereais	57
4.4.3	Ensaio com os solventes Tween 80 e P-123	58
4.5	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	59
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5	RESULTADOS	61
5.1	ENSAIOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DA CLOROFILA	63
5.1.1	Ensaio com o solvente éter	63
5.1.2	Ensaio com o solvente álcool de cereais	63
5.1.3	Ensaio com os solventes Tween 80 e P-123	63
5.2	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	91

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A necrose pulpar em dentes decíduos é predominantemente causada pelo processo da cárie dentária que pode levar ao desenvolvimento de lesão periapical e afetar o germe do dente permanente em formação. A terapia pulpar em dentes com necrose pulpar visa à erradicação da infecção nos canais radiculares e à prevenção da perda dentária (TAVARES et al., 2011). O sucesso do tratamento endodôntico depende de muitos fatores, mas o principal objetivo é a diminuição ou eliminação da infecção bacteriana do sistema de canais radiculares (FARIA et al., 2005; COGULU et al., 2007).

A instrumentação químico-mecânica dos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar tem como principal finalidade eliminar a infecção microbiana. No entanto, alguns fatores podem dificultar esta instrumentação, tais como: a complexa anatomia do sistema de canais radiculares, a presença de foraminas acessórias na região de furca, a reabsorção radicular ectópica e o comportamento do paciente infantil (PINHEIRO et al., 2009). Por isso, medicamentos intracanais têm sido utilizados como curativo de demora no tratamento de dentes decíduos com necrose pulpar, de forma que os agentes antimicrobianos possam difundir para regiões que não são acessíveis à instrumentação e assim diminuir a infecção bacteriana (FARIA et al., 2005). Muitas substâncias têm sido utilizadas como medicação intracanal em dentes decíduos, dentre elas o formocresol, paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio (FARIA et al., 2005). Apesar dos protocolos utilizados para estas substâncias demonstrarem, na maioria dos casos, efetividade no tratamento endodôntico de dentes decíduos, apresentam algumas limitações, como a realização do tratamento em duas sessões. Esta condição é complicada quando o paciente infantil possui menos de cinco anos de idade e/ou apresenta comportamento difícil durante o tratamento odontológico.

Alternativas e protocolos mais eficientes para a desinfecção de canais radiculares têm sido propostos nos últimos anos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) é uma delas e constitui uma técnica que tem se mostrado promissora como coadjuvante na redução bacteriana intracanal em dentes

permanentes (BONSOR et al., 2006b; SOUKOS et al., 2006; FOSCHI et al., 2007; FONSECA et al., 2008; GARCEZ et al., 2008; PAGONIS et al., 2010; KRANZ et al., 2011) e, mais recentemente, em dentes decíduos (PINHEIRO et al., 2009).

A TFDa é uma estratégia que se baseia no princípio da interação de um fotossensibilizador (FS) exógeno específico, que é aplicado na região alvo e, em seguida, é irradiado por uma fonte de luz na presença de oxigênio, sendo que esta interação causa a citotoxicidade celular das bactérias (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). O mecanismo de ação ocorre quando o FS absorve os fótons da fonte de luz, passa para o estado de excitação, reage com o oxigênio molecular e forma espécies altamente reativas e de pouca vida, que induzem necrose celular e morte das bactérias (SOUKOS; GOODSON, 2011). A TFDa é uma técnica pesquisada por diferentes autores nos últimos anos como coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional, na tentativa de eliminar os microrganismos persistentes ao preparo químico-mecânico. É uma terapia rápida, prática e de fácil aplicação clínica, não desenvolve resistência microbiana (TAVARES et al., 2010; UPADYA; KISHEN, 2010) e não causa danos às células da região periapical (GEORGE; KISHEN, 2007; XU et al., 2009).

Estudos *in vitro* (SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; GARCEZ et al., 2007; FIMPLE et al., 2008) e *in vivo* (BONSOR et al., 2006a, 2006b; GARCEZ et al., 2008, 2010; PINHEIRO et al., 2009) demonstraram que quando a TFDa é associada ao tratamento endodôntico convencional, há uma morte significativa de bactérias e um crescimento bacteriano diminuído, quando comparado com os resultados da instrumentação químico-mecânica isolada. No entanto, os parâmetros utilizados nesses estudos, como o tipo de FS, sua concentração, o tempo de aplicação, o tipo de fonte de luz, o tempo de exposição à luz, a energia de fluência e a potência da luz variam bastante e um protocolo de aplicação da TFDa ainda não está bem estabelecido na literatura.

Durante muito tempo alguns fatores foram limitantes para a disseminação da terapia fotodinâmica (TFD), entre eles o alto custo das substâncias fotossensibilizadoras e dos equipamentos a laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) (ACKROYD et al, 2001). É interessante notar que para minimização destes custos, grandes esforços têm sido realizados na busca de novas

formulações de FS, que absorvam a luz em comprimentos de onda variados, apresentem uma boa eficácia na TFDa, sejam seletivos para o alvo desejado e não causem efeitos colaterais nos tecidos do hospedeiro. Dessa forma, produtos de fontes naturais de fácil obtenção e/ou de facilidade sintética, como a clorofila (CL), têm sido propostos como FS em TFD e, mais recentemente, em TFDa. Adicionalmente, fontes de luz não-convencionais, como os diodos emissores de luz (LED), têm sido utilizadas como equipamentos na TFDa, com resultados semelhantes ao uso do laser e com um custo-benefício bem melhor, pois os equipamentos à base de LED custam em média 30% menos que os lasers (SOARES, 2006; VOLPATO et al., 2011).

Assim, se faz pertinente investigar a possibilidade de desenvolvimento de novos sistemas de aplicação à TFDa, visando novos fármacos e fontes de iluminação alternativas, combinando alta eficiência e custo reduzido. Dessa forma, o uso da CL como um FS associado ao uso do LED como fonte de luz poderá ser uma alternativa viável para a eliminação bacteriana das infecções endodônticas.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

O uso da luz como agente terapêutico surgiu há mais de 4000 anos, quando os egípcios descobriram que através da ingestão de plantas e com a ação da luz solar, era possível tratar doenças como o vitiligo. No Egito, Índia e China, algumas doenças de pele começaram a ser tratadas com o auxílio da luz, assim como o raquitismo e a psicose (ACKROYD et al., 2001). No entanto, o conceito de morte celular induzida pela interação da luz com agentes químicos só começou a ser empregado de maneira científica no início do século XX, quando Oscar Raab, um estudante de medicina, realizou as primeiras experiências com tratamento fotodinâmico. Esse autor descobriu que a combinação do corante vermelho de acridina com a luz solar foi letal para as culturas de paramécios (RAAB, 1900). Durante uma tempestade com raios, houve alteração das condições luminosas do ambiente no momento dos experimentos, o que levou o autor a postular que esse efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas com a absorção da luz pela CL. Alguns anos depois, Von Trappeiner realizou a primeira aplicação médica da associação entre o corante eosina e exposição à luz branca para o tratamento de um câncer de pele (VON TAPPEINER; JESIONEK, 1903).

A TFD é baseada no princípio de que um agente FS (corante) quando é ativado pela luz em um comprimento de onda específico, na presença de oxigênio, causa uma citotoxicidade celular. A reação de exposição do FS à luz resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio altamente reativas, como o oxigênio singleto e radicais livres, que danificam proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (HAMBLIN; HASAN, 2004; AMARAL et al., 2010).

A reação envolvida decorre, primariamente, da excitação eletrônica do corante pela luz, levando-o a uma transição do estado fundamental ao estado singleto excitado. Nessa etapa, as moléculas do FS podem retornar ao estado fundamental emitindo energia na forma de fluorescência, através da liberação de

fótons, ou podem fazer a transição para o estado tripleto de alta energia. O estado tripleto pode reagir com o oxigênio endógeno para produzir oxigênio singleto e outras espécies de radicais, causando uma rápida e seletiva destruição do tecido alvo. Existem dois mecanismos pelos quais o FS no estado tripleto pode reagir com as biomoléculas. Na reação do tipo I ocorre transferência direta entre elétron/hidrogênio do FS no estado tripleto excitado e os componentes do sistema, o que produz íons radicais livres, que tendem a reagir rapidamente com o oxigênio no estado fundamental. Esta reação pode resultar em espécies citotóxicas, como peróxido de hidrogênio, íons hidroxila, radicais hidroxila e ânion superóxido, que são extremamente tóxicas aos microrganismos. Na reação do tipo II ocorre a transferência direta de energia do FS no estado tripleto, com a geração de oxigênio singleto, um agente altamente reativo e responsável pela morte celular (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; SOUKOS; GOODSON, 2011). Ambos os processos produzem espécies de oxigênio reativas, altamente tóxicas, que são capazes de alterar irreversivelmente os componentes vitais das células, resultando em dano letal oxidativo. As reações do tipo I e II podem ocorrer simultaneamente e é difícil fazer a distinção entre estes dois mecanismos, pois dependem principalmente das características do FS, dos substratos intracelulares e da concentração de oxigênio do meio (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Segundo Amaral et al. (2010), a reação do tipo II é considerada como a predominante no dano fotooxidativo às células.

Nas últimas décadas, a TFD tem sido amplamente empregada no tratamento do câncer, com resultados positivamente surpreendentes. Em adição, ela também tem sido pesquisada para o tratamento de outras doenças como a degeneração macular, psoríase, artrite, arterioesclerose, dentre outras (HAMBLIN; HASAN, 2004). Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado que a TFD apresenta também propriedades antimicrobianas e pode ser utilizada no tratamento de infecções. O uso de antibióticos para destruição seletiva de microrganismos representa um dos mais revolucionários progressos realizados na medicina científica, o que resultou no tratamento e algumas vezes na completa erradicação de doenças antes consideradas incuráveis (JORI; BROWN, 2004). No entanto, com o passar do tempo, as bactérias têm desenvolvido mecanismos de resistência contra drogas antimicrobianas que antes eram consideradas altamente efetivas. Como as bactérias se replicam muito rápido, uma mutação que ocorre inicialmente em um

microrganismo e o auxilia a sobreviver na presença de um antibiótico, poderá ser rapidamente difundida na população microbiana. A prescrição excessiva e inapropriada de antibióticos, associada ao uso inadequado destes por parte dos pacientes, exacerbaram o problema da resistência bacteriana. Mais recentemente, o aumento significativo do crescimento das bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos estimulou a busca por tratamentos alternativos, que sejam mais convenientes e menos onerosos para eliminar doenças microbianas (HAMBLIN; HASAN, 2004).

A TFDa surge então como uma promissora terapia alternativa contra microrganismos, pois pode causar a destruição de bactérias, fungos, leveduras e vírus pela ativação do FS com a presença da luz e de oxigênio (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O desenvolvimento de resistência após essa terapia parece ser improvável, já que nas células dos microrganismos, o oxigênio singlete e os radicais livres formados no processo interagem com muitas estruturas celulares em diferentes caminhos metabólicos. Os microrganismos não conseguem desenvolver resistência à ação citotóxica da TFDa devido à natureza molecular primitiva do oxigênio singlete (SOUKOS; GOODSON, 2011). As espécies de oxigênio reativas agem sobre múltiplos alvos nas células bacterianas, tais como proteínas, enzimas, membrana citoplasmática e ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico, resultando em morte instantânea (TAVARES et al., 2010). Como a TFDa resulta em mecanismos de morte não específicos, as chances da bactéria adquirir resistência ao tratamento são reduzidas (GEORGE; KISHEN, 2008; UPADYA; KISHEN, 2010). A TFDa é igualmente efetiva contra bactérias resistentes a alguns antibióticos, e uma fotossensibilização repetida não induz a uma seleção de espécies resistentes (HAMBLIN; HASAN, 2004). O estudo de Tavares et al. (2010) mostrou que após a TFDa, as bactérias foram incapazes de recuperar sua atividade metabólica e que há uma falta de mecanismos de resistência após consecutivas sessões de fotossensibilização.

As vantagens da TFDa em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais são: eliminação rápida e imediata da célula bacteriana; não há a necessidade de manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as

lesões por longos períodos de tempo; não ocorre o desenvolvimento de mecanismos de resistência dos microrganismos; a terapia fica confinada à área da lesão pela aplicação localizada do corante e restrição da irradiação (WILSON, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007); poucos efeitos adversos; e não ocorre o recrescimento de microrganismos após o tratamento (TAVARES et al., 2010).

As aplicações da TFDa na odontologia estão crescendo rapidamente, com destaque para o uso no tratamento das infecções orais (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A TFDa tem sido estudada como procedimento promissor na eliminação de bactérias, em casos de doenças pulpares (BONSOR et al., 2006a, 2006b; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; GARCEZ et al., 2007, 2008; BERGMANS et al., 2008; FIMPLE et al., 2008; FONSECA et al., 2008), doenças periodontais (SOUKOS et al., 2003) e cáries dentárias (TESSAROLLI, 2010; MANG; TAYAL; BAIER, 2012).

A TFDa tem sido testada como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico tradicional, ou seja, após a instrumentação químico-mecânica dos canais radiculares, é realizada a TFDa com o objetivo de eliminar as bactérias remanescentes e, com isso, diminuir as chances de uma reinfecção.

Soukos et al. (2006) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de investigar a ação da TFDa sobre patógenos endodônticos. O FS utilizado foi o azul de metileno (AM) e houve exposição ao laser de diodo a 665nm. Eles concluíram que a TFDa pode ser utilizada como procedimento coadjuvante para eliminar bactérias residuais do sistema de canais radiculares após o tratamento endodôntico padrão. Williams, Pearson e Colles (2006) também fizeram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a TFDa em bactérias endodônticas *in vitro*. Foi utilizado o azul de toluidina (TBO) associado ao laser de diodo a 633nm e esta terapia foi bastante eficaz na morte de bactérias endodônticas. Os efeitos da TFDa sobre o *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) em dentes experimentalmente infectados foram avaliados por Foschi et al. (2007). Os autores utilizaram o AM como corante e o laser de diodo como fonte de luz, e conseguiram uma redução de 78% na viabilidade do E. faecalis. Garcez et al. (2007) testaram a efetividade da TFDa para eliminar biofilmes bacterianos dos canais radiculares *in vitro*. O FS aplicado foi o conjugado entre polietilenoimina (PEI) e clorina e6 e o laser de diodo foi acionado a um comprimento de onda de 660nm. A

associação da TFDa ao tratamento endodôntico convencional inibiu o crescimento microbiano em 98% e após 24 horas (h) o recrescimento bacteriano também foi diminuído. Os estudos de Fonseca et al. (2008) investigaram os efeitos da TFDa sobre o *E. faecalis in vitro*. Com a associação do TBO e do laser houve uma redução de 99,9% na contagem de bactérias. Fimple et al. (2008) analisaram a ação da TFDa sobre uma infecção polimicrobiana endodôntica *in vitro*. Eles aplicaram o AM seguido da exposição ao laser de diodo e obtiveram uma diminuição de 80% no crescimento bacteriano quando associada à instrumentação químico-mecânica. O estudo *in vitro* de Souza et al. (2010) avaliou os efeitos antibacterianos da TFDa com AM ou TBO e aplicação do laser de diodo como suplemento à instrumentação dos canais radiculares contaminados com *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a TFDa não exerceu um efeito suplementar significativo na viabilidade das bactérias. Kranz et al. (2011) estudaram o efeito da TFDa sobre o *E. faecalis* utilizando o laser de diodo associado ao FS clorina hidroxifenil tetra (mTHPC). Houve a completa supressão do *E. faecalis* quando foi associado o mTHPC a 50 μ M e iluminação com 100J/cm². Ng et al. (2011) tiveram como finalidade avaliar os efeitos antimicrobianos da TFDa com o AM e exposição à luz vermelha em dentes humanos infectados *ex vivo*. Houve uma redução significativa da quantidade de bactérias presentes no sistema de canais radiculares após associação da terapia endodôntica e da TFDa.

A partir do sucesso da TFDa sobre as bactérias endodônticas nos estudos *in vitro*, algumas pesquisas começaram a ser realizadas em pacientes com necessidades endodônticas, de maneira que a TFDa fosse aplicada após a instrumentação químico-mecânica dos canais radiculares infectados. Bonsor et al. (2006b) tiveram como objetivo determinar o efeito antimicrobiano da TFDa como coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional em pacientes que apresentavam pulpite irreversível. Após a terapia endodôntica convencional, eles aplicaram o TBO seguido do laser de diodo por 120 segundos (seg) e observaram que a TFDa foi bastante eficaz como complementação à instrumentação químico-mecânica. Os mesmos autores (BONSOR et al., 2006a) compararam *in vivo* o tratamento endodôntico com aplicação da solução de ácido cítrico a 20%, complementado pela TFDa, com o tratamento endodôntico à base de ácido cítrico a 20% e hipoclorito de sódio a 2,25% e TFDa. A TFDa com a utilização do TBO e laser de diodo foi considerada um regime alternativo ao uso do hipoclorito de sódio como

um agente de limpeza dos canais radiculares. Garcez et al. (2008) analisaram a associação da TFDa com o tratamento endodôntico convencional *in vivo*. O laser de diodo a 40mW e 660nm foi utilizado juntamente com o FS clorina e6 conjugado ao PEI e houve uma diminuição do crescimento bacteriano. Pinheiro et al. (2009) aplicaram a TFDa no tratamento endodôntico de dentes decíduos. O laser de diodo a 660nm por 40seg, associado com o TBO a 0,005%, foi utilizado após a realização do tratamento endodôntico dos pacientes infantis. A instrumentação resultou numa redução de 82,59% das bactérias viáveis, enquanto que quando houve uma associação com a TFDa a redução microbiana aumentou para 98,37%.

Quando um composto fotoativo é aplicado no sistema de canais radiculares, ele vai ter acesso a bactérias residuais nos canais principais, istmos, canais laterais, túbulos dentinários e é bem provável que ele possa se difundir pelos tecidos periapicais. Durante a TFDa, a luz vai excitar o FS dentro do canal radicular, mas pode também afetar as células periapicais do hospedeiro que tenham absorvido o corante. Portanto, é importante estabelecer a segurança da TFDa, e determinar a janela terapêutica por onde a bactéria pode ser eliminada, mas de maneira que as células do hospedeiro permaneçam intactas (SOUKOS; GOODSON, 2011). Xu et al. (2009) testaram se as doses de FS utilizadas na TFDa para a eliminação de microrganismos dos canais radiculares são capazes de induzir efeitos citotóxicos significativos em fibroblastos e osteoblastos da região gengival de humanos em cultura. Os resultados mostraram que a TFDa tem potencial no âmbito clínico para fornecer uma janela terapêutica ampla, por meio da qual as bactérias residuais nos canais radiculares podem ser mortas sem causar danos às células dos tecidos periapicais do hospedeiro. Em adição, George e Kishen (2007) demonstraram que a citotoxicidade da TFDa fica restrita à região do ápice radicular, já que os radicais de oxigênio formados têm um curto tempo de vida e a distância de difusão é bastante limitada. A citotoxicidade causada pela TFDa foi significativamente menor quando comparada com a irrigação antimicrobiana tradicional com hipoclorito de sódio. Além disso, eles concluíram que a TFDa produz um efeito insignificante sobre as células humanas.

2.2 FONTES DE LUZ

A TFD requer uma fonte de luz que ative a substância fotossensibilizadora por meio da exposição à luz visível de baixo potencial, em um comprimento de onda específico. Esta luz deve ser monocromática e centrada na banda de absorção do FS utilizado, ou seja, tem que conseguir excitá-lo, para transferir energia a fim de que a reação fotodinâmica seja desencadeada. Os tecidos humanos transmitem eficientemente luz vermelha, e uma longa ativação do FS resulta na penetração profunda da luz (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O sucesso da TFD é altamente dependente de fatores relacionados à luz utilizada na ativação do FS. O comprimento de onda de fotoativação, a dose de luz aplicada no sítio alvo, a intensidade da luz, e o tempo de espera entre a aplicação do fármaco e a iluminação são alguns dos principais fatores que podem influenciar no êxito da TFD (GEROLA, 2010).

Com relação às fontes de luz, as primeiras a serem utilizadas para TFD foram lâmpadas convencionais com luz não coerente e policromática, que apresentavam um forte componente térmico associado e assim era complicado calcular a sua dosimetria (ACKROYD et al., 2001; AMARAL et al., 2010). Várias fontes de luz com filtros específicos que permitiam selecionar o comprimento de onda de maior penetração nos tecidos e a absorção máxima do fármaco foram posteriormente utilizadas na fotossensibilização de fármacos em TFD: luz pulsada, luz não coerente (projeto de slides), lâmpada de xenônio, entre outras. No entanto, com o surgimento dos primeiros equipamentos a laser, este tipo de luz se tornou o mais utilizado na TFD devido às suas excelentes propriedades e à sua efetividade (ACKROYD et al., 2001).

As principais características do laser são: monocromaticidade, pois a luz é composta por apenas um comprimento de onda conhecido; alta intensidade; caráter direcional, já que o feixe de luz do laser é composto por fótons propagando-se na mesma direção; e coerência, pois as ondas se mantêm sincronizadas. Além disso, Ackroyd et al. (2001) salientam que a dosimetria da luz laser é fácil de calcular e a luz pode ser transmitida por uma fibra óptica para o local do tratamento. As principais vantagens do laser incluem: concentração elevada de energia; pouca

dispersão de energia à medida que a luz se propaga; seletividade, ou seja, possibilidade de iluminação de um meio composto por materiais diversos e somente interação com um determinado componente; facilidade de uso; potência adequada; emissão de um único comprimento de onda; e possibilidade de acoplamento a fibras ópticas (SOARES, 2006).

Uma variedade de lasers pode ser utilizada dependendo da característica e da fase em que se encontra a lesão. Os lasers de alta potência foram os primeiros a serem pesquisados para desinfecção dos canais radiculares e demonstraram inicialmente ser seguros e apresentaram uma efetividade antimicrobiana contra diversos microrganismos (MEIRE et al., 2009). No entanto, alguns estudos mostraram que o efeito antibacteriano do laser de alta potência não foi superior quando comparado com o tratamento endodôntico convencional com irrigação com hipoclorito de sódio (MEIRE et al., 2009; BAGO et al., 2013).

Estudos posteriores mostraram que os lasers de alta potência, a depender da quantidade de calor gerado, podem causar efeitos indesejáveis, tais como, uma carbonização da dentina, anquilose radicular, reabsorção radicular e necrose periapical (FIMPLE et al., 2008; MEIRE et al., 2009; BAGO et al., 2013). Em adição, Bago et al. (2013) salientam que o laser de alta potência tem grandes dificuldades em eliminar bactérias gram-positivas, como por exemplo o *E. faecalis*. Meire et al. (2009) testaram dois tipos de lasers de alta potência contra o *E. faecalis in vitro* e os resultados mostraram que os lasers utilizados não foram capazes de afetar a viabilidade desta bactéria. Isto pode ser atribuído a alta resistência deste microrganismo ao calor, devido à estrutura da sua parede celular. Assim, o uso do laser de alta potência, quando aplicado nos canais radiculares, a depender da dose aplicada pode provocar um aquecimento térmico local e causar a morte bacteriana, mas também pode gerar danos nas estruturas dentárias adjacentes e nos tecidos periodontais.

Dessa forma, para minimizar as desvantagens dos lasers de alta potência, foi proposta a aplicação do laser de baixa potência associado a um FS para o tratamento de infecções endodônticas. A utilização do laser de baixa potência na TFDa é uma estratégia em que uma energia baixa do laser é utilizada para ativar um

FS, e o oxigênio singleto liberado desta reação pode causar um dano à membrana e ao DNA dos microrganismos (BAGO et al., 2013).

Um grande impulso na utilização de fontes de luz lasers em TFD foi o desenvolvimento dos aparelhos lasers baseados em diodos de baixa intensidade, que apresentam luz monocromática e coerente. O laser de diodo alia luz de potência considerável (particularmente na região do vermelho) com precisão sobre o tecido a ser irradiado, e é um equipamento simples, portátil e tem um excelente custo-benefício. Além disso, a dose de radiação é facilmente calculada, a área de irradiação é controlada, o que focaliza o tratamento. A luz pode ser transmitida por meio de fibra óptica, estas fibras podem receber adaptações para melhor acessar a lesão alvo, como microlentes e difusores. Os efeitos obtidos por este tipo de laser não ocorrem por aumento da temperatura, mas sim pelas reações fotoquímicas entre o FS, a luz e o substrato (AMARAL et al., 2010).

O surgimento do laser de diodo fez com que o custo de aparelhagem fosse diminuído, mas ainda assim é alto, inviabilizando a maior difusão da técnica, principalmente em países subdesenvolvidos (SOARES, 2006; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A maioria dos estudos que investigou a ação da TFDa sobre microrganismos endodônticos utilizou o laser de diodo de baixa intensidade como fonte de luz e obteve excelentes resultados (BONSOR et al., 2006a, 2006b; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; FOSCHI et al., 2007; GARCEZ et al., 2007, 2008, 2010; FIMPLE et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; KRANZ et al., 2011; NG et al., 2011).

Recentemente, fontes de luz não-laser, como o LED, têm sido aplicadas na TFD como uma alternativa ao uso dos lasers convencionais. O LED consiste em um dispositivo de luz monocromática que apresenta um baixo componente térmico, com banda estreita de comprimento de onda. No LED predomina o mecanismo espontâneo de radiação com pouca energia para geração de luz, apresentando largo espectro de luz não coerente e com maior divergência (AMARAL et al., 2010). De acordo com o estudo desenvolvido por Volpato et al. (2011), apesar da luz emitida pelo LED não ser coerente, se forem utilizados os mesmos parâmetros de dosimetria, os grupos que utilizam o laser e o LED apresentam resultados similares.

As fontes à base de LED, apesar de apresentarem potência muito inferior ao laser, são bem mais econômicas, pequenas, leves e altamente flexíveis. Estão disponíveis no mercado em todas as regiões espectrais, incluindo-se a do vermelho (SOARES, 2006). Além disso, os aparelhos de LED podem ser confeccionados em diferentes formas e tamanhos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). O laser e o LED produzem irradiação num comprimento de onda específico, porém a irradiação LED é emitida numa faixa mais ampla do espectro, não é coerente e colimada, como a irradiação laser (SOARES, 2006).

Com o desenvolvimento dos aparelhos LED, começaram a surgir estudos que aplicaram tal fonte de luz à TFD. Mais recentemente, estudos têm verificado eficiência dessa fonte de luz na TFDa e têm causado um impacto neste tipo de tratamento, já que o LED apresenta baixo custo e baixo nível de dano ao tecido humano (SOARES, 2006; SCHLAFER et al., 2010; GEROLA et al., 2011a; VOLPATO et al., 2011). Em adição, a Federação Dentária Americana aprovou o uso de LED em humanos e considerou este tipo de fonte de luz de risco não significativo (VOLPATO et al., 2011).

2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Como o principal agente ativador no processo fotodinâmico é considerado o corante fotossensível, este deve possuir várias propriedades físico-químicas, farmacológicas e fotobiológicas, que o qualifiquem como bom agente para a terapia, isto é, ter alta eficiência e ao mesmo tempo apresentar mínimos efeitos colaterais (SOARES, 2006).

Neste sentido, as principais características necessárias a um FS com potencialidade em TFD são: possuir uma banda de absorção ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz a ser utilizada; alta estabilidade biológica; eficiência fotoquímica; mínimo efeito tóxico às células normais; (AMARAL et al., 2010) alta seletividade pela célula-alvo, ou seja, afinidade e penetração no tecido doente; baixa toxicidade no escuro, deve mostrar toxicidade local somente após ativação pela luz; fotossensibilidade não prolongada; facilidade de obtenção, simplicidade na formulação e reprodutibilidade; e propriedades farmacocinéticas

favoráveis, como rápida eliminação pelo corpo (SOARES, 2006). Além disso, deve ter facilidade de obtenção em escala industrial, um bom custo-benefício, e ter facilidade de armazenamento (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Além das características citadas, os FS devem possuir algumas propriedades fotofísicas favoráveis: coeficiente de absorvidade molar elevado em comprimentos de onda maiores que 650nm do espectro eletromagnético, faixa conhecida como janela terapêutica, na qual se tem menor absorção de luz pelos tecidos biológicos; alto rendimento quântico de estado tripleto, para obter grandes concentrações da droga ativada; alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete; alta afinidade de ligação com os microrganismos; um largo espectro de ação; baixa afinidade de ligação com células humanas para evitar o risco de fotodestruição dos tecidos do hospedeiro; e baixo rendimento de reação de fotobranqueamento do FS (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; SOUKOS; GOODSON, 2011).

No caso dos FS é importante que o estado tripleto seja bem povoado, ou seja, que ocorra a presença de muitos elétrons e fótons, e relativamente de maior duração. Se isto ocorrer, o FS excitado terá tempo de reagir com seu ambiente (transferência eletrônica/reações redox), ou transferir sua energia de excitação a uma molécula de oxigênio e produzir o altamente reativo oxigênio singlete. Assim, o FS danifica os alvos biológicos, principalmente por oxidação (AMARAL et al., 2010).

Um processo adicional que o FS pode sofrer é o de fotobranqueamento, causado por modificações na estrutura da molécula através de reações paralelas. A molécula sofrerá reação e o produto não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando assim de exercer sua ação terapêutica (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). O fotobranqueamento é evidenciado pelas mudanças nos espectros de absorção, interferindo na eficiência de processos relativos à TFD. Uma mesma molécula de FS fotoestável pode formar inúmeras moléculas da espécie citotóxica responsável pela ação curativa. Contudo, além das reações com tecidos celulares, há possibilidade de destruição fotoinduzida do próprio FS, levando à diminuição da concentração da molécula fotoativa e, assim, comprometendo os processos envolvidos na oxidação de biomoléculas. Por outro lado, os processos de fotobranqueamento dos FS são favoráveis à aplicação terapêutica quando se pensa

em eliminação do FS do organismo e diminuição de efeitos colaterais prolongados (GEROLA, 2010).

O grau de hidrofobicidade de fármacos utilizados em TFD está diretamente relacionado as características necessárias à técnica, como seletividade e afinidade com tecidos doentes. Os FS com caráter hidrofóbico acentuado possuem a vantagem de acumularem-se preferencialmente em células com neoplasia; essa seletividade é decorrente da associação do FS a lipoproteínas do plasma e, conhecidamente, células tumorais possuem inúmeros receptores de lipoproteínas de baixa densidade, devido à grande demanda por colesterol. A localização e associação preferencial dos FS com as membranas biológicas, nas quais seus principais componentes, os lipídios e as proteínas, são os principais alvos da destruição fotoinduzida, são de importância fundamental para o sucesso da TFD (JORI, 1996). A alta hidrofobicidade por um lado é uma característica favorável, já que auxilia na incorporação dos FS às membranas biológicas, mas, por outro, é responsável pela autoagregação dos mesmos em meio aquoso, processo indesejável à TFD. A autoagregação em ambientes aquosos leva a menor solubilidade do fármaco, diminuição do tempo de vida de seu estado tripleto e, conseqüentemente, diminuição do rendimento de oxigênio singlete (GEROLA, 2010).

A fotossensibilização da bactéria está relacionada com a carga do FS. Em geral, FS neutros ou aniônicos unem-se eficientemente às bactérias gram-positivas e a inativam após a aplicação da luz, enquanto eles se unem em alguma extensão na membrana externa das bactérias gram-negativas, mas não a inativam após a iluminação. A alta susceptibilidade das espécies gram-positivas é explicada pela presença de uma camada relativamente fina e porosa de peptidoglicano e ácido lipoteicoico em torno da sua membrana citoplasmática, o que permite ao FS se difundir para o interior da célula (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; AMARAL et al., 2010). A membrana citoplasmática das bactérias gram-negativas possui uma camada interna e uma camada externa, e esta é rica em lipopolissacarídeos e age como uma barreira funcional e física entre a célula e o meio externo (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; AMARAL et al., 2010). As moléculas de lipopolissacarídeos são carregadas negativamente e previnem a absorção de FS neutros e aniônicos (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN, 2009). Portanto, bactérias gram-negativas são

menos susceptíveis à TFDa devido à presença de uma membrana externa (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O pouco tempo de vida e a difusão limitada do oxigênio singlete faz com que haja necessidade de uma associação bem próxima entre o FS e o local alvo. Portanto, é importante garantir a absorção adequada do FS pela célula bacteriana com a finalidade de adquirir uma morte bacteriana apropriada (GEORGE; KISHEN, 2008). O tempo de pré-irradiação corresponde ao tempo decorrido da aplicação do FS no alvo e sua ativação pela luz. É um ponto crítico para o sucesso da TFDa, uma vez que se o FS não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela luz irá resultar na formação de espécies tóxicas em local não desejado. O ideal é que o FS consiga se ligar ao microrganismo ou ultrapassar a barreira da membrana celular antes que ocorra a ativação pela fonte de luz (AMARAL et al., 2010).

Os FS utilizados na TFD do câncer são principalmente os tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas) devido à baixa toxicidade intrínseca em células de mamíferos e pelas características específicas de localização. Enquanto que na TFDa, os FS que têm sido estudados pertencem a diferentes grupos de compostos, como os xantênicos, fenotiazínicos, acridinas e conjugados de clorina (GEROLA, 2010).

Na endodontia, os FS derivados das fenotiazinas têm sido os mais amplamente empregados nas pesquisas envolvendo TFDa. As fenotiazinas são compostos heteroaromáticos tricíclicos, são corantes azuis, como o TBO e o AM. Em baixas concentrações não produzem ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose para causar danos às células, como queratócitos e fibroblastos (AMARAL et al., 2010). Eles têm como alvo os componentes do DNA e da membrana celular externa das bactérias (SOUKOS et al., 2006). Eles apresentam carga positiva e por isso são mais efetivos contra microrganismos gram-positivos do que contra gram-negativos.

O AM é um FS carregado positivamente, hidrofílico e com uma absorbância máxima de 664nm (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN, 2009). Tem sido utilizado como FS para eliminar microrganismos da microbiota endodôntica em diversos estudos (SOUKOS et al., 2006; FOSCHI et al., 2007; FIMPLE et al., 2008; PAGONIS et al.,

2010; NG et al., 2011). Em razão de sua natureza hidrofílica, acompanhada de baixo peso molecular e carga positiva, consegue ultrapassar os canais de porinas-proteínas da membrana externa das bactérias gram-negativas (SOUKOS et al., 2006). O AM interage predominantemente com macromoléculas aniônicas de lipopolissacarídeos, o que resulta na geração de dímeros de AM, que participam assim do processo de fotossensibilização (AMARAL et al., 2010; SOUKOS; GOODSON, 2011). O AM tem a capacidade de produzir oxigênio singlete e outras espécies de oxigênio reativas, quando ligados a interfaces carregadas negativamente (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN, 2009).

O TBO é um corante orgânico redox da classe das fenotiazinas de cor azul com absorção máxima na região do vermelho visível. É formado por uma estrutura tricíclica simples, sendo que seu tamanho e forma simples o tornam 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 (AMARAL et al., 2010). Por isso, ele tem se mostrado efetivo em diversos estudos como agente FS na TFDa e tem sido um dos mais utilizados no tratamento de infecções endodônticas (BONSOR et al., 2006a, 2006b; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; FONSECA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; SCHLAFFER et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Fatores como a sua capacidade de difusão, a quantidade de absorção e adsorção pela membrana, o tempo de contato, e a capacidade de gerar oxigênio reativo podem explicar o seu potencial destrutivo (BERGMANS et al., 2008). Segundo Amaral et al. (2010), o TBO tem grande afinidade com a endotoxina bacteriana das bactérias gram-negativas e liga-se rapidamente a elas, e por isso tem um maior efeito fotooxidativo quando comparado ao AM.

Outra classe de FS que tem sido pesquisada na TFDa é a dos conjugados de clorina. A clorina é um tipo de porfirina em que um dos anéis pirrólicos é reduzido. A quebra do anel porfirínico faz com que a clorina possua alta absorção de luz na região de 600nm, e por isso possui alta fotossensibilidade, o que a torna um FS potencial em TFD (TEGOS et al., 2006). As clorinas têm sido utilizadas desde 1942 como drogas fotossensibilizadoras em TFD contra o câncer, e a clorina e6 tem sido o composto químico mais utilizado devido à sua baixa toxicidade nas células do corpo humano (ULATOWSKA-JARZA et al., 2006). Além disso, Embleton et al. (2002) ressaltam que a clorina e6 apresenta uma maior liberação de oxigênio singlete, quando comparada com outras clorinas. Garcez et al. (2007, 2008, 2010) têm utilizado nos seus estudos como FS um conjugado covalente entre um polímero sintético básico e uma clorina e6, e têm obtido bons resultados com a sua utilização como FS na TFDa em infecções endodônticas. Este FS foi desenvolvido para se ligar e penetrar rapidamente na parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas, enquanto que não se ligam fortemente às células do hospedeiro, já que sua absorção é lenta devido ao seu peso molecular alto (GARCEZ et al., 2008). Kranz et al. (2011) também investigaram o efeito do FS mTHPC, um conjugado de clorina, e obtiveram resultados promissores na TFDa.

2.3.1 Clorofila

A descoberta da CL como um novo tipo de FS para ser utilizado na TFD ocorreu no ano de 1987 pelo Departamento de Microbiologia da Universidade de Yonsei e pelo Departamento de Química da Universidade de Ajou (PARK et al., 1989; LEE et al. 1990). A CL é o mais abundante e amplamente distribuído pigmento verde nas plantas e pode ser facilmente obtida de plantas naturais em grandes quantidades e a baixo custo (LEE et al., 1990). Além disso, a CL é um ingrediente comum dos alimentos, e pode ser facilmente metabolizado pelo corpo humano (LI et al., 2007).

A CL é um composto da classe das clorinas e sua estrutura molecular consiste em um anel porfirínico com um dos anéis pirrólicos reduzido, e com um íon magnésio coordenado aos nitrogênios, além de uma cadeia fitílica longa e apolar que promove alta hidrofobicidade à molécula. A cadeia fitílica é importante na

agregação e/ou interação com ambientes hidrofóbicos (AGOSTIANO et al., 2000; FIEDOR et al., 2003), enquanto o tipo de metal complexado ao anel porfirínico afeta propriedades fotofísicas e a sua estabilidade, além de favorecer a formação de interações com sítios específicos (LIMANTARA et al., 2006). A CL mostra características hidrofóbicas devido à ausência de carga e a presença de um grupo fitil, uma cadeia longa e apolar ligada à estrutura da porfirina.

A CL é encontrada em abundância na natureza e atua como pigmento fundamental na fotossíntese, capturando energia luminosa juntamente com pigmentos acessórios, como carotenóides, bacterioclorofilas e xantofilas. A radiação capturada é convertida em energia química e armazenada como carboidratos e outros constituintes dos tecidos vegetais, liberando oxigênio como resíduo. Na natureza, o número de CLs diferentes não é muito grande. Aproximadamente cerca de 10 tipos de CLs têm sido isolados de partes verdes de plantas. Em alguns organismos, apenas uma CL é detectada, enquanto em outros a CL majoritária é acompanhada por outros pigmentos verdes auxiliares. Dentro da classe das CLs têm-se as CLs *a*, *b*, *c* e *d*, e bacterioclorofilas *a* e *b*. As CLs *a* e *b* diferem entre si pelos substituintes do carbono C-3. Na CL *a* tem-se um grupo metil e na CL *b* um grupo aldeído. Esses grupos alteram as duas principais faixas de absorção de luz pela mudança na distribuição eletrônica. A ocorrência das CLs *c* e *d* é observada em algas associadas às CLs *a* (GEROLA, 2010). O componente verde mais abundante é a CL *a*, seguido pela CL *b*, as CLs *c* (*c1* e *c2*), CL *d* e protoclorofila. Em bactérias fotossintéticas têm-se as bacterioclorofilas (SOARES, 2006).

A CL *a* está presente em todas as plantas que têm a participação do oxigênio durante o processo de fotossíntese e é a principal CL encontrada nas algas e em plantas que produzem sementes, podendo ser facilmente extraída destes vegetais (SOARES, 2006).

Muita atenção tem sido dada para estudar os derivados da CL preparados de produtos naturais, devido às suas propriedades fotoativas que podem ser de grande interesse para os tratamentos com TFD para o câncer. Lee et al. (1990) analisaram a ação fotodinâmica da CL em tumores de ratos e humanos *in vitro* e observaram que a CL é um excelente FS quando associado à luz no comprimento de onda de 650nm. Park et al. (1989) estudaram pela primeira vez a ação da CL como FS

juntamente com a ação da luz na cura do câncer de abdômen em ratos *in vivo*. Os resultados desse estudo comprovaram que a CL é um efetivo FS de tumor *in vivo*.

A CL obtida de folhas de plantas pode ser transformada em diferentes derivados que exibem uma estrutura esquelética básica de compostos de clorina (LI et al., 2007). As CLs mais utilizadas nos estudos são a CL *a* e *b*. Por exemplo, a CL (Mg-Chl) pode ser modificada para a sua versão desmetalada, onde o íon metálico magnésio é substituído por dois átomos de hidrogênio, e assim formar a feofitina (Pheo), através da reação de hidrólise ácida, com caráter mais hidrofóbico do que seu precursor. Os átomos de hidrogênio ligados covalentemente aos nitrogênios do anel tetrapirrólico da Pheo são facilmente substituídos pelos íons zinco e cobre, e formam complexos metálicos conhecidos como metaloclorofilas, denominados de CL de zinco (Zn-Chl) e de cobre (Cu-Chl), respectivamente. Esses compostos possuem alta estabilidade fotoquímica em meio ácido e maior fotoestabilidade quando comparadas a Mg-Chl (LIMANTARA et al., 2006; GEROLA et al., 2011b). Derivados mais hidrofílicos das CLs são obtidos pela retirada da cadeia fitílica por hidrólise ácida controlada, obtendo-se o feoforbídeo (Pheid), que por sua vez pode ser metalado à clorofilida de zinco (Zn-Chld) (GEROLA, 2010).

Muitos estudos têm sido publicados demonstrando as excelentes propriedades fotodinâmicas dos derivados da CL contra os diferentes tipos de câncer (LI et al., 2007), mas poucas pesquisas têm sido realizadas para testar a habilidade da CL como FS para a TFDa (GEROLA et al., 2011a).

O espectro de absorção da CL mostra alta absorção de luz no visível (incluindo a região do vermelho, de 660 a 670nm), e longo tempo de vida do estado excitado, que implica num alto rendimento quântico de oxigênio singlete. Essas propriedades são muito apropriadas e extremamente favoráveis para a sua utilização como FS para a aplicação em TFD (SOARES, 2006; GEROLA et al., 2011a). Por outro lado, o grande caráter hidrofóbico das moléculas de CL responsáveis pelo fenômeno de autoagregação em meio aquoso pode ser um fator limitante de sua aplicação na técnica (GEROLA, 2010).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar a ação da CL como agente fotossensibilizador e do LED como fonte de luz na TFDa quando aplicada contra o *E. faecalis*.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Testar diferentes tipos de solventes para a CL
 - Testar a atividade fotodinâmica *in vitro* da CL frente à bactéria *E. faecalis*
 - Avaliar a capacidade do LED como fonte de luz alternativa para ser aplicado na TFDa contra o *E. faecalis*
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *E. faecalis* (American Type Culture Collection [ATCC 29212]), gram-positivo e anaeróbio facultativo. Esta cepa padrão foi gentilmente cedida pelo Departamento de Microbiologia da USP-São Paulo. Antes de iniciar cada experimento, a cultura pura de *E. faecalis* foi ativada em caldo de “Brain Heart Infusion” (BHI) a 37°C por 24h.

O cultivo do microrganismo foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos (min) em temperatura ambiente (Eppendorf, Centrifuge 5415 C), sendo o sobrenadante descartado e o pellet re-suspenso em 0,85% de solução salina.

As concentrações da bactéria foram ajustadas para 10^7 UFC/ml no Espectofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000) a 600nm e 0,183 absorbância para todos os experimentos.

4.2 FOTOSSENSIBILIZADOR

O FS testado neste estudo foi a CL. A CL utilizada foi a CL derivada do espinafre (Sigma-Aldrich, Reino Unido). A CL apresenta-se na forma de pó e foram realizados testes para encontrar um solvente ideal que dissolva a CL, não exerça nenhum tipo de alteração nas suas propriedades, e não cause ação tóxica sobre os microrganismos. Os estoques de CL foram armazenados no freezer a -80°C e no escuro para evitar degradação. Durante todos os experimentos, houve um cuidado para que a CL não entrasse em contato com a luz ambiente e sofresse degradação. Por isso, todos os ensaios foram realizados no escuro.

Como FS padrão, o controle positivo, foi utilizado o TBO (Sigma-Aldrich, Reino Unido). Nos grupos que utilizaram o TBO como FS, ele foi preparado na hora do experimento, na concentração de 100µg/ml.

4.3 FONTE DE LUZ

A fonte de luz utilizada em todos os experimentos foi o LED (Figura 1). O LED é um diodo emissor de luz vermelho de baixa potência (630nm) (Protótipo do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil). O equipamento emite luz vermelha polarizada e não-coerente nos seguintes parâmetros técnicos: comprimento de onda com banda de emissão centrada em 637nm (± 15 nm) e densidade de potência de 40mW.

Figura 1 - Aparelho LED utilizado nos experimentos

Para a irradiação, a ponta do LED foi introduzida verticalmente e centralmente bem próxima ao poço, para que ocorra a sua completa iluminação.

4.4 ENSAIOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DA CLOROFILA

Um volume de 100 μ l do inóculo calibrado foi inserido em cada poço da placa de microtitulação e 100 μ l da solução teste (éter, álcool de cereais, Tween 80 ou P-

123) foi adicionado. Cada poço foi agitado e aguardou-se 1min para que ocorra a mistura.

Imediatamente após a mistura, 25µl da suspensão foi removida de cada poço e foram realizadas diluições seriadas. As alíquotas de cada diluição foram espalhadas na superfície da placa em Ágar BHI. As placas foram armazenadas em microaerofilia, ou seja, em uma jarra fechada com uma vela acesa, para que a quantidade de oxigênio fosse reduzida e a quantidade de gás carbônico aumentada. Quando a vela se apagava, a jarra foi colocada na estufa a 37°C por 24h. O número de bactérias que sobreviverem ao tratamento foi contado em cada placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.1 Ensaios com o solvente éter

1mg de CL foi dissolvida em 100µl de solução de éter. Os grupos utilizados foram:

- G1a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl solução salina
- G2a - 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter puro
- G3a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter puro + CL
- G4a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 70% + Água destilada 30%
- G5a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 70% + Água destilada 30% +CL
- G6a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 60% + Água destilada 40%
- G7a - 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 60% + Água destilada 40% +CL
- G8a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 50% + Água destilada 50%
- G9a – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Éter 50% + Água destilada 50% +CL

4.4.2 Ensaios com o solvente álcool de cereais

1mg de CL foi dissolvida em 5ml de álcool de cereais, o que fornece uma concentração final de 0,2mg/ml. Os grupos utilizados foram:

- G1b – 100µl suspensão bacteriana + 100µl solução salina
- G2b – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Álcool de cereais
- G3b – 100µl suspensão bacteriana + 100µl Álcool de cereais + CL

4.4.3 Ensaios com os solventes Tween 80 e P-123

O Tween 80, também conhecido como Polysorbate 80, é um surfactante polimérico neutro pertencente à linha Tween. Os grupos hidrofílicos do Tween 80 são polímeros de óxido etileno. Essa linha de surfactantes é composta por ésteres de sorbitan etoxilados e, dependendo do tipo de ácido graxo de origem e grau de etoxilação, obtêm-se produtos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílico, que se adaptam a diversas aplicações. O Tween 80 possui concentração micelar crítica (cmc) de $0,012 \text{ mmol L}^{-1}$, e tem sido usado em produtos alimentícios e como emulsificante na fabricação de medicamentos.

As micelas poliméricas de Pluronic (P-123) são constituídas por copolímeros em três blocos, que possuem grupos oxipropilênicos (PPO) na parte interna mais hidrofóbica, e oxietilênicos (PEO) nas extremidades mais hidrofílicas. Essas micelas possuem ampla aplicabilidade na solubilização de moléculas lipofílicas ligadas covalentemente ao bloco hidrofóbico das micelas formadas, ou os substratos são mantidos na micela por interações hidrofóbicas e de Van der Waals. O balanço de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela combinação da quantidade de monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos. Isto resulta em uma grande versatilidade desses compostos, devido ao número de copolímeros comercialmente disponíveis para usos distintos em diferentes áreas, que incluem a solubilização de fármacos e a liberação controlada.

Foram preparadas soluções aquosas dos surfactantes P-123 e Tween 80 em uma concentração 1% (m/v). O Tween 80 e o P-123 foram inicialmente dissolvidos em água. 1,12ml de Tween ou P-123 foi dissolvido em 112ml de água, sob constante agitação. Tomou-se o cuidado de se trabalhar com tensoativos em concentrações seguramente acima da cmc e com baixas concentrações de cromóforos, a fim de garantir a possível incorporação das moléculas às micelas em solução.

A concentração da CL foi de $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A CL foi dissolvida em 112ml de Tween 1% ou P-123 1% sob agitação, em temperatura de 30°C e no escuro. O tempo para dissolução da CL foi de 24 à 36h.

G1c – 100µl da suspensão bacteriana + 100µl solução salina

G2c – 100µl da suspensão bacteriana + 100µl Tween 1%

G3c – 100µl da suspensão bacteriana + 100µl P-123 1%

G4c – 100µl da suspensão bacteriana + 100µl solução de Tween 1% + CL

G5c – 100µl da suspensão bacteriana + 100µl solução de P-123 1% + CL

4.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

O experimento foi realizado com 18 grupos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos grupos do experimento da TFDa

GRUPOS	FS	TEMPO FS	LED	TEMPO LED
1d	SEM	0	SEM	0
2d	TBO	1	SEM	0
3d	CL+TWEEN	1	SEM	0
4d	CL+TWEEN	5	SEM	0
5d	CL+P123	1	SEM	0
6d	CL+P123	5	SEM	0
7d	CL+TWEEN	1	COM	1
8d	CL+TWEEN	1	COM	5
9d	CL+TWEEN	5	COM	1
10d	CL+TWEEN	5	COM	5
11d	CL+P123	1	COM	1
12d	CL+P123	1	COM	5
13d	CL+P123	5	COM	1
14d	CL+P123	5	COM	5
15d	TBO	1	COM	1
16d	TBO	1	COM	5
17d	SEM	0	COM	1
18d	SEM	0	COM	5

Um volume de 100µl do inóculo calibrado foi inserido em poços alternados da placa de microtitulação e 100µl da solução do FS (CL ou TBO) foi adicionado. Nos grupos de utilizaram a CL, ela foi dissolvida em soluções aquosas de Tween 80 ou P-123. No grupo controle negativo (G1d), foi adicionado à suspensão bacteriana 100µl de solução salina ao invés do FS. Cada poço foi agitado com a ponta da pipeta esterilizada e o tempo de pré-irradiação foi de 1 ou 5min, a depender do grupo a ser estudado, para que ocorra a homogeneização do inóculo com o FS. A

ponta do LED foi introduzida verticalmente e centralmente sobre os poços e foram irradiadas em temperatura ambiente e no escuro. O LED foi acionado durante 1 ou 5min. Para analisar o efeito dos FS sem ação da luz, nos grupos G1d a G6d, o LED não foi acionado.

Imediatamente após o tratamento, 25µl da suspensão foi pipetado de cada poço e foi submetida a diluições seriadas. As alíquotas de cada diluição foram espalhadas na superfície da placa em Ágar BHI. As placas foram armazenadas em microaerofilia e foram colocadas na estufa a 37°C por 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após o período de 24h, a jarra foi aberta e verificou-se se havia crescimento bacteriano nas placas. A contagem do número de colônias foi realizada em cada placa (UFC/ml).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As UFC foram transformadas em valores de Log_{10} UFC para normalizar os dados antes da comparação estatística e reduzir assim a variável de heterogeneidade. A média e o desvio padrão (DP) de cada experimento foram calculados.

Inicialmente foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,753$) para verificar a normalidade de distribuição dos dados. O teste de Levene ($p=0,012$) foi realizado para avaliar a homogeneidade dos dados.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($H=0,003$) foi aplicado para rejeitar a hipótese nula. Posteriormente foi feito o teste post-hoc de comparação entre pares para observar se houve diferenças entre os grupos ($p<0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DA CLOROFILA

5.1.1 Ensaios com o solvente éter

Os testes demonstraram que o solvente éter foi capaz de solubilizar completamente a CL. No entanto, no grupo em que o éter puro foi utilizado sem a adição da CL (G2a) houve a completa erradicação da bactéria *E. faecalis*. O éter puro (G2a) foi muito tóxico para o *E. faecalis*, pois impediu totalmente o seu crescimento. Assim, foram testadas várias diluições do éter em água destilada (G3a a G7a), de maneira que o éter dissolva a clorofila e não seja tóxico para o microrganismo. Entretanto, os grupos que utilizaram o éter diluído em água a várias concentrações, também causaram a completa morte bacteriana (G4a, G6a e G8a).

5.1.2 Ensaios com o solvente álcool de cereais

O álcool de cereais também foi eficaz como solvente para a CL. No entanto, no grupo G2b, não houve crescimento bacteriano, demonstrando que o *E. faecalis* não resiste ao álcool de cereais.

5.1.3 Ensaios com os solventes Tween 80 e P-123

Verificou-se que os surfactantes Tween 80 e o P-123 a 1% em solução aquosa não foram citotóxicos para o microrganismo investigado e foram capazes de manter a CL solubilizada. Nos grupos G2c, G3c, G4c e G5c, a contagem bacteriana foi semelhante ao grupo controle (G1c), sem diferenças significantes.

5.2 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

O número de UFC/ml no grupo controle negativo (G1d) serviu de base para a comparação dos grupos.

Na tabela 2 podem ser observados os valores de $\log_{10}$ (UFC/ml) dos grupos, a média, desvio padrão (DP) e intervalo de confiança (IC).

Tabela 2 - Valores da média de $\log_{10}$ UFC dos grupos, desvio padrão ($\pm$ DP) e intervalo de confiança (IC)

G	N	Média	DP	IC de 95%		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
1d	3	4,43	0,05	4,30	4,55	4,38	4,48
2d	3	4,37	0,05	4,23	4,51	4,32	4,43
3d	3	4,40	0,05	4,26	4,54	4,37	4,47
4d	3	4,41	0,04	4,30	4,51	4,38	4,46
5d	3	4,44	0,00	4,42	4,45	4,44	4,45
6d	3	4,44	0,01	4,40	4,48	4,43	4,46
7d	3	4,33	0,01	4,29	4,37	4,32	4,35
8d	3	4,38	0,02	4,33	4,42	4,36	4,40
9d	3	4,41	0,02	4,34	4,47	4,38	4,43
10d	3	4,34	0,02	4,29	4,38	4,32	4,36
11d	3	4,39	0,01	4,35	4,43	4,38	4,41
12d	3	4,36	0,02	4,31	4,40	4,34	4,38
13d	3	4,38	0,03	4,29	4,47	4,35	4,42
14d	3	4,35	0,01	4,32	4,38	4,35	4,37
15d	3	4,31	0,01	4,26	4,35	4,29	4,32
16d	3	4,38	0,04	4,27	4,48	4,35	4,43
17d	3	4,35	0,08	4,14	4,55	4,26	4,42
18d	3	4,29	0,02	4,24	4,34	4,28	4,32
Total	54	4,37	0,05	4,36	4,39	4,26	4,48

No gráfico 1 estão apresentados os resultados da média de contagem das UFC mL^{-1} para todos os grupos após transformação em $\log_{10}$ e os valores dos respectivos DP de cada grupo.

Gráfico 1 - Representação dos resultados da média da contagem das UFC mL⁻¹ e o DP em cada grupo após transformação de log₁₀.

O grupo que utilizou a CL diluída em Tween, com tempo de pré-irradiação de 1min e ação do LED de 1min (G7d) teve uma redução estatisticamente significativa na contagem bacteriana ($p < 0,05$), quando comparada com o grupo controle (G1d). O mesmo foi observado para os grupos CL dissolvida em Tween ou P-123, com tempo de pré-irradiação de 5min e aplicação do LED durante 5min (G10d e G14d).

TFDa utilizando TBO numa concentração de 100ug/ml e irradiação LED por 1min (G15d) provocou reduções significantes no crescimento bacteriano, quando comparado com o grupo controle negativo (G1d).

A irradiação do LED durante 5min sem a presença de um FS (G18d) foi capaz de provocar uma diminuição estatisticamente significativa na média dos valores de log₁₀, quando comparado com o grupo controle (G1d).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo do tratamento endodôntico em dentes decíduos e permanentes é a desinfecção eficiente do sistema de canais radiculares e a prevenção da reinfecção. Tradicionalmente, este tratamento é realizado pela combinação de uma instrumentação mecânica e uma irrigação química, pelo uso de soluções desinfetantes e pela ação de medicamentos intracanaís entre as sessões (BAGO et al., 2013). No entanto, bactérias residuais são encontradas em cerca de metade dos canais obturados, mesmo que a técnica endodôntica tenha sido bem executada. Segundo Amaral et al. (2010), a maioria das falhas ou insucessos endodônticos está relacionada com a persistência de microrganismos que resistiram ao preparo químico-mecânico ou à medicação intracanal. Isto ocorre, principalmente, porque a anatomia do sistema de canais radiculares é complexa, o que torna a completa erradicação das bactérias quase impossível de ser realizada (XU et al., 2009). Sendo assim, novas metodologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de se obter uma maior eficácia na terapia endodôntica. A TFDa surge como uma técnica bastante promissora que, quando aliada ao tratamento endodôntico convencional, visa eliminar microrganismos persistentes à instrumentação químico-mecânica na dentição decídua e permanente (BONSOR et al., 2006b; SOUKOS et al., 2006; GARCEZ et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009).

Estudos através de métodos moleculares têm comprovado que a microbiota de dentes com necrose pulpar é polimicrobiana, variada, complexa, e composta por bactérias facultativas, anaeróbias gram-negativas, bactérias negras pigmentadas e estreptococcus (PAZELLI et al., 2003; SILVA et al., 2006; RUVIÉRE et al., 2007; TAVARES et al., 2011). Entre as espécies isoladas dos canais radiculares de dentes necróticos, merece destaque o *E. faecalis*, um microrganismo altamente resistente às terapias endodônticas em canais radiculares infectados e o principal responsável pelos casos de insucessos (COGULU et al., 2007, 2008). Apesar de ser encontrado em pequenas concentrações na cavidade bucal, ele é o patógeno mais frequentemente isolado em dentes com infecção persistente após tratamento endodôntico (SEDGLEY; LENNAN; CLEWELL, 2004). Segundo Sedgley et al. (2005), estudos bacteriológicos diferentes têm demonstrado que o *E. faecalis* está

presente em 29-46% dos dentes obturados com lesões periapicais em dentes permanentes. Cogulu et al. (2008) observaram que entre as bactérias presentes em dentes decíduos com necrose pulpar, o *E. faecalis* foi associado à presença de radiolusência periapical e dor prévia. O estudo de Radcliffe et al. (2004) demonstrou que o *E. faecalis* é altamente resistente ao hipoclorito de sódio, mesmo em concentrações mais elevadas. Esses achados evidenciam a habilidade do *E. faecalis* para sobreviver ao tratamento antibacteriano comum e persistir no meio ambiente pós endodôntico do canal radicular (SUNDQVIST et al., 1998).

E. faecalis foi escolhido como microrganismo padrão neste estudo porque é a espécie microbiana mais comumente associada a infecções endodônticas persistentes, já que possui diversos fatores de virulência, o que dificulta sua remoção pelos meios químicos e mecânicos. Seu comportamento resistente pode ser atribuído a vários fatores: sobrevive à ação dos agentes antimicrobianos; tem crescimento rápido; potencial de colonizar a dentina e os túbulos dentinários; sobrevive mesmo em condições físicas desfavoráveis e de escassez nutricional; possui propriedades físicas de formar biofilme bacteriano, e mantém interação com células compostas; e habilidade para causar uma monoinfecção nos canais radiculares (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; GOMES et al., 2008; POLY et al., 2010). Ele é gram-positivo, anaeróbio facultativo e é um dos microrganismos que tem se mostrado mais resistente à TFDa nos estudos, o que confirma seu status de patógeno altamente resistente (BERGMANS et al., 2008; POLY et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Desta forma, muitos experimentos *in vitro* que testaram a ação da TFDa sobre infecções endodônticas têm utilizado o *E. faecalis* como microrganismo padrão, tal como foi realizado neste estudo (SOUKOS et al., 2006; FOSCHI et al., 2007; BERGMANS et al., 2008; FONSECA et al., 2008; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; KRANZ et al., 2011). Essas pesquisas têm demonstrado que a TFDa é capaz de diminuir substancialmente a infecção por *E. faecalis* em canais de dentes permanentes, mas que ainda não foi capaz de eliminá-la completamente. Isto sugere a necessidade de novos estudos em busca de um protocolo de TFDa que consiga erradicar completamente este microrganismo do sistema de canais radiculares.

Os resultados da maioria dos estudos indicam que a TFDa tem grande potencial para ser utilizada como procedimento antimicrobiano coadjuvante após o

debridamento químico-mecânico endodôntico tradicional (SOUKOS et al., 2006; FOSCHI et al., 2007; BERGMANS et al., 2008; FONSECA et al., 2008; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; KRANZ et al., 2011). No entanto, as diferenças metodológicas encontradas em todas essas pesquisas tornam a comparação entre elas difícil, o que salienta a importância da padronização de um protocolo para a fotodestruição bacteriana dos canais radiculares (SOUKOS; GOODSON, 2011).

A maioria dos experimentos que testou a ação da TFDa na desinfecção de canais radiculares foi realizada *in vitro*, mas há diferenças no tipo de metodologia aplicada. Os estudos utilizaram a suspensão planctônica (PELOI et al., 2008; KRANZ et al., 2011), dentes extraídos (FOSCHI et al., 2007; GARCEZ et al., 2007; FIMPLE et al., 2008; FONSECA et al., 2008; LIM et al., 2009; SOUZA et al., 2010) ou uma associação destas duas técnicas (GARCEZ et al., 2006; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; MEIRE et al., 2009; PAGONIS et al., 2010; SCHLAFFER et al., 2010). O presente estudo utilizou a suspensão planctônica como metodologia, por ser o primeiro passo para testar a ação de um novo protocolo na TFDa. No entanto, para confirmação dos achados deste estudo, será necessário uma próxima etapa para analisar a ação da TFDa sobre o *E. faecalis* no microcosmo de um biofilme, de forma que haja uma maior proximidade com o que ocorre na clínica. Em adição, alguns autores pesquisaram a ação da TFDa como técnica coadjuvante à instrumentação químico-mecânica dos canais radiculares *ex vivo* (BERGMANS et al., 2008; NG et al., 2011) e *in vivo* (BONSOR et al., 2006a, 2006b; GARCEZ et al., 2008, 2010; PINHEIRO et al., 2009).

Segundo Foschi et al. (2007), a inabilidade da TFDa em eliminar completamente os microrganismos dos canais radiculares pode ser atribuída à complexidade do sistema de entrega da luz e da dosimetria utilizada. O desenvolvimento de sistemas de emissão de luz mais eficientes é necessário para estabelecer parâmetros de tratamento ótimos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; SOUKOS; GOODSON, 2011).

Alguns estudos testaram a ação direta do laser de alta potência sobre o sistema de canais radiculares na erradicação de microrganismos da microbiota endodôntica (MEIRE et al., 2009; BAGO et al., 2013). No entanto, segundo Schlafer et al. (2010), o risco de causar injúrias aos tecidos periapicais com a geração de

calor impõe limitações aos aparelhos de laser de alta potência na endodontia. O desenvolvimento recente da tecnologia do laser de diodo de baixa potência tem se tornado bastante atrativa e tem sido muito aplicada na TFDa, principalmente devido ao custo menor, quando comparado com os lasers convencionais (PELOI et al., 2008). Bago et al. (2013) compararam *in vitro* a efetividade dos lasers de alta e baixa potência na eliminação do *E. faecalis* em canais radiculares. O laser de baixa potência, quando associado ao tratamento endodôntico convencional, foi bem mais eficiente que o de alta na desinfecção microbiana. Dickers et al. (2009) verificaram se houve elevação da temperatura em canais radiculares *in vitro* quando utilizado o laser de baixa potência e observaram que o aumento da temperatura foi muito pequeno e considerado seguro para os tecidos dentários e periodontais. De acordo com Seal et al. (2002), a maior vantagem do laser de baixa potência no tratamento das infecções dos canais radiculares é a ausência de efeitos secundários térmicos nos tecidos circundantes às raízes.

O laser de diodo de baixa potência foi a fonte de luz mais utilizada nos estudos e apresentou excelentes resultados para aplicação na TFDa na endodontia (BONSOR et al., 2006a, 2006b; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; GARCEZ et al., 2006, 2007, 2008, 2010; FOSCHI et al., 2007; BERGMANS et al., 2008; FIMPLE et al., 2008; FONSECA et al., 2008; LIM et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; KRANZ et al., 2011; NG et al., 2011). No entanto, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento esta tecnologia ainda apresenta um custo muito elevado para ser utilizada na prática clínica. Dessa forma, o LED tem sido uma alternativa viável ao uso do laser devido ao seu excelente custo-benefício (PELOI et al., 2008; SCHLAFER et al., 2010; VOLPATO et al., 2011). O LED apresenta uma forma de radiação monocromática e os corantes, como o AM e o TBO, absorvem altas doses de luz desta fonte (PELOI et al., 2008). A luz emitida pelo LED atinge uma área de superfície ampla para alvos biológicos, como pele, células e tecidos (GEROLA et al., 2011a). Além disso, o LED induz a um aumento de temperatura seguro quando aplicado sobre esmalte e dentina (SCHLAFER et al., 2010) e causa um baixo nível de dano aos tecidos humanos (GEROLA et al., 2011a; VOLPATO et al., 2011). Com base no estudo realizado por Volpato et al. (2011), após a irradiação por LED houve sobrevivência dos fibroblastos e proliferação celular.

O uso do LED como fonte de luz alternativa tem obtido resultados favoráveis quando utilizado na TFDa em infecções endodônticas. Peloi et al. (2008) associaram o LED ao AM para a aplicação da TFDa contra os microrganismos *Staphilococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Candida Albicans* (*C. Albicans*) e encontraram excelentes resultados. O LED foi bastante efetivo e, quando comparado com os estudos que utilizaram o laser, apresentou resultados muito similares. Schlafer et al. (2010) testaram a ação do LED associado ao TBO sobre microrganismos comuns em infecções endodônticas. Este estudo mostrou que a irradiação LED reduz significativamente o número de microrganismos endodônticos viáveis em suspensão planctônica e em raízes de dentes extraídos. A eficácia do LED como fonte de luz para a TFDa também foi confirmada nos estudos de Gerola et al. (2011a). Segundo Soares (2006), o sistema de iluminação à base de LED mostrou-se bastante satisfatório, principalmente nos ensaios com microrganismos, já que a irradiação LED é emitida numa faixa mais ampla do espectro. O mecanismo de fotossensibilização do LED sobre o FS segue o mesmo padrão que a maioria dos lasers utilizados: ocorre a geração de oxigênio singleto e tem ação contra uma variada gama de moléculas celulares, como os lipídios de membrana, as enzimas citoplasmáticas e os ácidos nucléicos (PELOI et al., 2008).

O comprimento de onda utilizado na maioria dos estudos varia de 633nm a 685nm, quando aplicado o laser de diodo (BONSOR et al., 2006a, 2006b; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; GARCEZ et al., 2006, 2007, 2008, 2010; FOSCHI et al., 2007; BERGMANS et al., 2008; FIMPLE et al., 2008; FONSECA et al., 2008; LIM et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; KRANZ et al., 2011; NG et al., 2011). Os autores que irradiaram com o LED utilizaram o comprimento de onda de 628nm (± 15 nm) (PELOI et al., 2008), 663nm (± 15 nm) (SCHLAFER et al., 2010) e 664nm (± 15 nm) (GEROLA et al., 2011a). O comprimento de onda utilizado no presente estudo foi de 637nm (± 15 nm), que corresponde à faixa de emissão do vermelho visível, muito próxima ao utilizado na maioria dos estudos que aplicaram o LED com esta mesma finalidade. Tal condição se justifica pelo fato de que essa faixa de emissão está localizada na denominada “janela terapêutica” (600-800nm), uma região espectral em que a luz apresenta menor absorção por componentes bioquímicos dos organismos vivos, como água, proteínas e DNA, o que aumenta a capacidade de penetração da luz

nos microrganismos marcados pelos FS. Este é um aspecto importante na TFDa e que embasou a presente pesquisa, de forma que a definição de protocolos de aplicação do LED para os diferentes tipos de microrganismos será fundamental para a popularização da aplicação clínica da TFDa na Odontologia e em outras áreas da saúde.

A energia de fluência é outro fator que apresenta grande variação nos estudos. O presente estudo utilizou $40\text{J}/\text{cm}^2$, com base no trabalho desenvolvido por Volpato et al. (2011), que demonstrou que este parâmetro de energia de fluência não compromete a atividade celular e não causa alteração nos tecidos humanos circunjacentes. Soukos et al. (2006), Fimple et al. (2008) e Ng et al. (2011) utilizaram valores de energia de fluência do laser um pouco acima do utilizado no presente estudo, enquanto que Foschi et al. (2007) e Pagonis et al. (2010) irradiaram com valores um pouco abaixo. Kranz et al. (2011) testaram 25, 50, 75 e $100\text{J}/\text{cm}^2$ e observaram que o aumento da energia do laser potencializa a morte bacteriana. Fonseca et al. (2008) alcançaram valores bem altos de energia de fluência do laser, em torno de $400\text{J}/\text{cm}^2$. Garcez et al. (2007) testaram diferentes tempos de iluminação e mostraram que há uma redução da contaminação bacteriana à medida que a energia de fluência do laser aumenta até que se atinge um platô, e um posterior aumento não vai causar mais nenhum tipo de efeito. Este limite foi alcançado neste estudo com uma energia de 9,6J durante 4min. Dentre os estudos que aplicaram o LED, Schlafer et al. (2010) utilizaram $30\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto Peli et al. (2008) e Gerola et al. (2011a) apenas $6\text{J}/\text{cm}^2$.

O tempo de aplicação da fonte de luz, seja ela laser ou LED, é outro ponto que apresenta muitas variáveis na literatura vigente. O tempo de aplicação do laser varia bastante, sendo que foram utilizados: 30seg (WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006), 2min (BONSOR et al., 2006a, 2006b), 2,5min (BERGMANS et al., 2008), 4min (SOUZA et al., 2010), 5min (SOUKOS et al., 2006; FONSECA et al., 2008), 10min (FOSCHI et al., 2007; PAGONIS et al., 2010), e até 20min (LIM et al., 2009) nas pesquisas com TFDa em infecções endodônticas. Os estudos de Fimple et al. (2008) e Ng et al. (2011) propuseram a aplicação do laser por 2,5min, seguido de uma pausa de 2,5min e uma segunda aplicação de 2,5min. Garcez et al. (2008) sugerem em seu estudo *in vivo* que a TFDa deve ser realizada em duas sessões clínicas. Isto porque, durante a primeira aplicação, o FS tem dificuldade em penetrar

profundamente no biofilme complexo e bem desenvolvido do sistema de canais radiculares. Após a primeira sessão, ocorre uma recolonização de microrganismos, mas o número de microrganismos viáveis é bem menor e há formação de um biofilme menos complexo em que o FS terá maior facilidade em penetrar. Além disso, a aplicação de hidróxido de cálcio como medicamento intracanal entre as sessões promove um aumento do pH do meio, o que pode facilitar a fotorreação na segunda sessão, já que a produção de espécies de oxigênio reativas é acelerada num meio alcalino.

Em relação às pesquisas que utilizaram o LED como fonte de luz sobre a microbiota endodôntica, o tempo de aplicação variou de 30seg (SCHLAFER et al., 2010) a 30min (PELOI et al., 2008; GEROLA et al., 2011a). Peli et al. (2008) testaram diferentes tempos de aplicação do LED (10, 20 e 30min) sobre os microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Foi constatado que a inibição do crescimento bacteriano é dependente do tempo de exposição do LED, já que com 30min a morte bacteriana foi bem maior que com 10 e 20min. No entanto, um tempo de aplicação da luz de 30min seria inviável para uma posterior aplicação clínica desta técnica, por isso na presente investigação optou-se por uma iluminação do LED por 1 ou 5min, o que seria um tempo mais adequado para a prática clínica. Observou-se no presente estudo que o LED quando aplicado por 5min sem ação de um FS, houve uma diminuição significativa na contagem bacteriana, quando comparado com o grupo controle.

É de fundamental importância que a fonte de luz seja absorvida pelo corante para que ocorra a ação antimicrobiana sobre as bactérias bucais, já que a maioria delas não absorve a luz visível de lasers que operam em baixa potência. De acordo com Amaral et al. (2010), o essencial na TFDa é a capacidade de excitar o FS em seu alvo com um mínimo de dano ao tecido vizinho. Por isso, a escolha do tipo de FS a ser utilizado na TFDa é fundamental para o sucesso do tratamento.

FS, como o TBO, AM, bem como derivados da clorina têm sido muito empregados em associação ao laser de baixa intensidade na tentativa de se alcançar efeitos bactericidas sobre a microbiota endodôntica. No entanto, as pesquisas utilizaram FS em concentrações e tempo de aplicação bastante variados,

o que torna complexa a comparação entre os estudos e a busca por um FS ideal para a TFDa em infecções endodônticas.

O TBO tem sido um FS bastante utilizado na TFDa, por ter a capacidade de absorver a luz em comprimentos de onda de 620-660nm, como os utilizados no laser vermelho. O TBO apresenta boas propriedades, tais como, capacidade de difusão e molhamento, penetração profunda nos biofilmes, quantidade alta de adsorção e absorção pelas membranas, maior tempo de contato, e capacidade de gerar oxigênio reativo (BERGMANS et al., 2008). No entanto, Bergmans et al. (2008) alertam que o TBO possa ter uma profundidade de penetração limitada nos biofilmes. Quando o TBO é utilizado em células bacterianas individuais ou em pequenos grupos de bactérias, elas são facilmente erradicadas pela TFDa. No entanto, em biofilmes mais complexos, a ação do TBO pode ser ineficiente. As concentrações do TBO utilizadas nos estudos variam de 10µg/ml a 100µg/ml (BONSOR et al., 2006a, 2006b; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; BERGMANS et al., 2008; MEIRE et al., 2009; SCHLAFFER et al., 2010; SOUZA et al., 2010). A concentração de TBO utilizada neste estudo foi de 100 µg/ml, semelhante ao utilizado por Schlafer et al. (2010), já que nesta concentração o TBO tem sua ação potencializada sem causar danos aos tecidos do hospedeiro.

Com base nos estudos que utilizaram o TBO como FS na TFDa em infecções endodônticas, observou-se que houve uma grande diminuição no crescimento bacteriano, mas não se conseguiu uma completa erradicação dos microrganismos do sistema de canais radiculares. No presente estudo, com a aplicação do TBO associado ao LED durante 1min, houve uma redução significativa na quantidade de bactérias, quando comparado com o grupo controle. No entanto, esta redução na contagem de UFC não foi muito grande, quando comparado com outros estudos encontrados na literatura. Um pré-requisito para a fotossensibilização efetiva é a deposição do corante na parede celular da célula de um organismo. Como resultado, para o TBO, fatores como a capacidade de difusão/molhamento, a profunda penetração no biofilme, a quantidade de absorção pelas membranas, o tempo de contato, e a capacidade de gerar oxigênio singlete pode definir seu potencial destrutivo. Outros fatores que podem explicar a inefetividade do TBO foram a baixa energia de fluência do LED ou o baixo tempo de irradiação.

Outro tipo de FS que tem sido muito utilizado nos estudos é o AM. Ele é um corante com alta absorção de luz no comprimento de onda de 665nm, demonstra habilidade em gerar oxigênio singlete e consegue penetrar facilmente nos túbulos dentinários (FIMPLE et al., 2008; PELOI et al., 2008). Segundo Peloi et al. (2008), o AM não tem dificuldades em atravessar a parede celular das bactérias gram-negativas, pois apresenta carga catiônica e, desta forma, liga-se facilmente à carga negativa dos lipopolissacarídeos presentes na parede celular destas bactérias. As gram-positivas têm apenas uma membrana citoplasmática externa de peptideoglicanos, o que permite ao AM atravessá-la muito facilmente. As concentrações do AM utilizadas nos estudos variam de 6,25µg/ml (FOSCHI et al., 2007; PAGONIS et al., 2010), 15µg/ml (SOUZA et al., 2010), 25µg/ml (SOUKOS et al., 2006; FIMPLE et al., 2008) a 50µg/ml (NG et al., 2011). No entanto, em nenhuma dessas concentrações o AM conseguiu 100% de eficácia sobre as bactérias endodônticas *in vitro*.

Os derivados da clorina são FS que têm sido bastante empregados na TFD contra células cancerígenas e têm sido sugeridos também na TFDa contra bactérias endodônticas. A clorina e6 foi associada ao PEI e foi testada como FS na TFDa em canais radiculares. Este FS tem uma alta eficácia contra espécies gram-positivas e gram-negativas e, quando associado ao laser de baixa intensidade, causou uma diminuição exacerbada do crescimento bacteriano em estudos *in vitro* e *in vivo* (GARCEZ et al., 2007, 2008, 2010). Kranz et al. (2011) também utilizaram na sua pesquisa *in vitro* um conjugado de clorina (mTHPC) como FS na TFDa em infecções endodônticas. A TFDa com a associação do mTHPC e do laser com energia de fluência de 100J/cm² conseguiu atingir a completa supressão do *E. faecalis*.

O tempo necessário para absorção do corante antes da iluminação é importante para o sucesso da TFD. Nas aplicações da TFDa, espera-se que o corante se una ao microrganismo ou chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular deste, e neste período o FS não sofra degradação antes da sua ativação pela fonte de luz (AMARAL et al., 2010). O tempo de pré-irradiação pode ser de 1min (WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; BERGMANS et al., 2008; SCHLAFER et al., 2010), 2min (GARCEZ et al., 2008, 2010; MEIRE et al., 2009; SOUZA et al., 2010), 3min (PINHEIRO et al., 2009), 5min (GARCEZ et al., 2006; SOUKOS et al.,

2006; FOSCHI et al., 2007; FONSECA et al., 2008; NG et al., 2011), 10min (GARCEZ et al., 2007; FIMPLE et al., 2008; PAGONIS et al., 2010) e 15min (KRANZ et al., 2011). O presente estudo utilizou o tempo de pré-irradiação de 1min para a ação do TBO, já que este tempo já demonstrou ser o mais efetivo nos estudos (WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; BERGMANS et al., 2008; SCHLAFER et al., 2010). Em relação à CL, foram testados os tempos de 1 e 5min. A grande maioria dos estudos faz uso de tempos variando de 1 a 5min, os quais têm sido suficientes para fotossensibilizar e inativar as espécies bacterianas. Além disso, são tempos que podem ser utilizados clinicamente, quando aplicados em pacientes com necrose radicular.

Konopka e Goslinski (2007) chamam a atenção para o fato de que o sucesso da TFDa é limitado por problemas nos FS sub-ótimos. Por isso, torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de novos FS, com características químicas, biológicas e clínicas mais favoráveis e com melhores propriedades ópticas. Além disso, o alto custo da TFDa na aplicação clínica também está relacionado ao alto custo dos FS utilizados nesta terapia. Portanto, é de fundamental importância o estudo de novos FS para a TFDa, cujas propriedades incluam alta eficiência, baixos efeitos adversos e custo reduzido (PELOI et al., 2008). A partir destas recomendações, este estudo se propôs a investigar a ação da CL como candidata a FS para a TFDa, pois, além de ser um produto natural, apresenta a melhor forma de reação de fotossensibilização por meio da fotossíntese das plantas, ou seja, ela consegue absorver a luz de maneira mais eficaz.

Sendo assim, a CL foi o FS escolhido para ser utilizado neste estudo, por ser um corante natural, de fácil obtenção, e que não apresenta propriedades tóxicas para a cavidade bucal, o que a torna muito adequada para aplicação em crianças. A CL apresenta excelentes propriedades fotodinâmicas e muitas pesquisas nos últimos anos têm sido publicadas utilizando-a como FS na TFD contra diferentes tipos de células cancerígenas (LIMANTARA et al., 2006; LI et al., 2007). Além disso, ela apresenta como vantagens um bom custo-benefício e não provocar efeito térmico quando aplicada nos tecidos humanos durante a iluminação (LI et al., 2007). No entanto, poucos estudos testaram a ação da CL como agente FS na TFDa contra microrganismos (PELOI et al., 2008; TESSAROLLI, 2010; GEROLA et al., 2011a).

A CL apresenta uma alta absorção de luz na região de 650-670nm, o que é uma característica importante para um FS candidato à TFDa, e bem próxima ao comprimento de onda irradiado pelo LED utilizado neste estudo. No experimento realizado por Gerola et al. (2011a), todos os derivados da CL investigados exibiram absorção da luz a 650-670nm e altos valores de coeficiente de absorção molar, o que está adequado para a região de emissão do LED. Em adição, a CL e seus derivados apresentam alta produção de oxigênio singlete, que são espécies altamente tóxicas responsáveis pela destruição de células via mecanismo tipo II, que é considerado o principal caminho para a atividade fotodinâmica (GEROLA et al., 2011a).

Soares (2006) estudou os efeitos da CL como FS sobre culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Em nenhuma das concentrações da CL utilizada foi observada uma fotoatividade frente às bactérias, isto é, as curvas de crescimento celular praticamente coincidem com o controle positivo. Por outro lado, no estudo de Gerola et al. (2011a), a CL exerceu uma ação fotodinâmica contra o *S. aureus* e alcançou 80% de morte bacteriana quando a concentração mais alta desta foi utilizada. No entanto, não pôde ser observado nenhum efeito fotodinâmico quando a CL foi utilizada associada ao LED contra o *E. coli*. Os autores postularam que a proximidade do FS com a região alvo é crucial para a eficácia da TFDa. As bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, têm apenas uma barreira de peptidoglicano externamente a membrana citoplasmática e apresenta uma carga positiva, o que facilita a união com a CL, que apresenta uma carga negativa. Por outro lado, as bactérias gram-negativas, como o *E. coli*, possuem uma membrana de lipopolissacarídeos extra, carregada negativamente, que repele a carga negativa da CL. Em adição, a CL também não exerceu nenhuma fotoinativação contra o fungo *C. albicans*, o que pode ser explicado pela presença de uma membrana nuclear de proteção, que pode impedir a penetração da CL no microrganismo e diminuir, assim, a fotoativação. No presente estudo, o grupo em que a CL foi solubilizada pelo Tween 80 e houve ação do LED por 1min, houve uma diminuição no número de UFC, quando comparado com o grupo controle. Além disso, quando a CL foi solubilizada com o Tween 80 ou com o P-123, com um tempo de pré-irradiação de 5min e aplicação do LED por 5min, também houve uma redução estatisticamente significativa na contagem bacteriana. No entanto, estas reduções observadas foram

pequenas e sem um significado clínico importante. Como este estudo foi um dos primeiros a utilizar a CL como FS associado ao LED como fonte de luz alternativa, essa tendência de diminuição no número de UFC se torna um achado importante. Novos experimentos são necessários para potencializar a ação da CL como FS na TFDa.

A fotoestabilidade dos compostos empregados na TFDa é um importante fator para o sucesso do tratamento, já que a reação de fotobranqueamento diminui a concentração do FS durante as sessões clínicas (GEROLA et al., 2011b). O processo denominado fotobranqueamento de substâncias cromóforas corresponde a reações químicas induzidas pela luz, onde as moléculas são transformadas em outros compostos. O decréscimo da concentração do FS original no sítio de ação da TFD, assim como o menor poder de absorção de luz do cromóforo modificado, pode acarretar numa menor quantidade de princípios ativos excitados e, assim, diminuir a ação fotodinâmica. Como consequência, ocorre uma menor formação de espécies citotóxicas, ou seja, o fotobranqueamento do FS é um aspecto negativo na eficácia do tratamento (SOARES, 2006). Soares (2006) comprovou em seu estudo que ocorre intensa reação de fotobranqueamento da CL durante a aplicação da luz. Com a diminuição da concentração do FS e, conseqüentemente, da capacidade de absorção de fótons, compromete-se a geração de oxigênio singlete ou de radicais livres. De acordo com Gerola et al. (2011a), a CL apresenta alto fotobranqueamento devido à sua grande capacidade de interação com o oxigênio singlete formado durante sua irradiação, já que o oxigênio se liga ao átomo de CL axialmente e causa, assim, a oxidação. Desta forma, o fotobranqueamento sofrido pela CL pode ser uma das justificativas da baixa atividade fotodinâmica observada nos ensaios *in vitro* sobre o microrganismo investigado neste estudo.

A efetividade da fotoativação e, subseqüentemente, da geração de radicais livres é influenciada por fatores, como: a interação das moléculas do FS; o meio físico-químico no local da aplicação; tempo de vida do oxigênio singlete produzido; e a disponibilidade de oxigênio no local da aplicação. Todos estes fatores são extremamente dependentes da natureza do solvente no qual o FS é dispersado (GEORGE; KISHEN, 2008). Estudos anteriores têm mostrado que as propriedades fotofísicas dos FS podem ser influenciadas pela polaridade e viscosidade do

solvente. O tempo de vida do oxigênio singleto é extremamente dependente do tipo de solvente utilizado (GEORGE; KISHEN, 2008).

O estudo de George e Kishen (2007) demonstrou que a susceptibilidade do *E. faecalis* à TFDa variou com o uso de diferentes solventes para o FS AM. O AM, quando dissolvido em uma mistura de etanol, glicerol e água (MIX), aprimorou o seu potencial de ação fotodinâmica durante a irradiação, quando comparado com o uso da água. Este solvente preveniu a agregação do AM e assim aumentou a produção de oxigênio singleto. Em adição, este solvente causou um extensivo dano à parede celular das bactérias durante a ativação pela luz e permitiu a penetração do FS dentro das células, atingindo alvos intracelulares como DNA e enzimas bacterianas (GEORGE; KISHEN, 2008). De acordo com Lim et al. (2009), uma das possíveis razões para o efeito bactericida limitado do AM baseado em água pode ser a inabilidade em penetrar no sistema de canais radiculares. A pobre liberação de oxigênio singleto e a absorção forte da luz pelo FS, quando este passa pelo lúmen do canal radicular, irá afetar a eficácia da TFD. A formulação do AM em MIX difunde-se mais profundamente nos túbulos dentinários quando aplicada nos canais radiculares, acelerando, assim, a morte bacteriana. Upadya e Kishen (2010) testaram a TFDa com AM dissolvido em água, em MIX e associado a um carregador de oxigênio. O AM solubilizado em MIX causou uma maior inativação das bactérias e uma maior quebra do biofilme bacteriano, quando comparado com o AM em água. A combinação com um carregador de oxigênio aumentou ainda mais a quebra da estrutura do biofilme e, conseqüentemente, aprimorou a inativação das bactérias.

Este estudo testou a solubilização da CL em diferentes tipos de solventes. Segundo Soares (2006), moléculas, como a CL, devem ser preparadas de modo a evitar a agregação num dado meio. A alta hidrofobicidade apresentada pela CL por um lado é uma característica favorável, já que auxilia na incorporação dela às membranas biológicas, mas, por outro, é responsável pela autoagregação da mesma em meio aquoso, processo indesejável à TFD. Nos estados auto-agregados, as moléculas excitadas têm sua energia suprimida por colisões entre as unidades de monômeros que constituem o próprio agregado. A autoagregação em ambientes aquosos leva a menor solubilidade do fármaco, diminuição do tempo de vida de seu estado tripleto e, conseqüentemente, diminuição da geração de oxigênio singleto (GEROLA, 2010).

Este estudo avaliou a utilização do éter puro e diluído em água a várias concentrações como solvente para a CL. A solubilização da CL em éter ocorreu de maneira uniforme, no entanto o éter foi um agente extremamente tóxico aos microrganismos e provocou a erradicação completa do *E. faecalis*. Os estudos realizados por Soares (2006) com a CL em soluções aquosas de etanol mostraram que o fenômeno da auto-agregação ocorre mesmo em soluções com teor de água relativamente baixo. O álcool de cereais também exerceu ação tóxica contra o *E. faecalis* e, por isso, não seria um solvente ideal para ser utilizado em TFDa. Ressalta-se ainda que a utilização de formulados com altas porcentagens de solventes orgânicos é imprópria para aplicação na TFDa devido à alta toxicidade, ou mesmo não muito adequada no caso de aplicação em tecidos humanos. Dessa forma, uma formulação mais conveniente é aquela que tem como veículo a água. Para se conseguir solubilizar moléculas hidrofóbicas de CL em meio aquoso, Soares (2006) propôs a incorporação das moléculas de CL em agentes tensoativos, ou surfactantes, que formem micelas em solução, tais como Tween 80 ou P-123.

O uso de surfactantes é conhecidamente efetivo na estabilização de moléculas hidrofóbicas em meio aquoso, tais como FS mantidos na forma de monômeros. Segundo Gerola et al. (2011a), para aplicações clínicas e farmacêuticas, é interessante utilizar surfactantes poliméricos neutros, como Tween 80 e P-123, devido à sua baixa toxicidade quando comparados a surfactantes convencionais. A incorporação de moléculas hidrofóbicas em ambientes micelares pode: (a) promover a estabilização de fármacos no estado monomérico, de maneira que as propriedades fotofísicas sejam similares à do composto em solvente orgânico; (b) facilitar a infiltração dos fármacos pelos tecidos humanos; (c) propiciar maior seletividade e eficiência de entrega dos fármacos a tecidos alvos, principalmente diante de interações específicas entre as estruturas do agente tensoativo e de componentes do tecido celular; (d) adequar a viscosidade da solução a fluídos biológicos; (f) promover alterações localizadas de pH sem interferir na acidez de fluídos do corpo; (g) exercer atividades necróticas a microrganismos nocivos com propriedades cooperativas do surfactante ao fármaco (SOARES, 2006).

Assim, a presente investigação testou também, como solventes para a CL, o Tween 80 e o P-123 a 1% e foi observado que ambos foram eficientes na solubilização da CL em água, e não causaram nenhum efeito tóxico ao

microrganismo estudado. Soares (2006) estudou o comportamento da CL em soluções aquosas de P-123 e Tween 80 a 1% e constataram que estes compostos exibiram quase o mesmo espectro que o observado em etanol, o que sugere que grande parte das moléculas de CL são mantidas como monômeros por esses sistemas de surfactantes (GEROLA et al., 2011a). Assim, a formulação das CLs em surfactantes atenua o problema da baixa solubilidade e da alta tendência à autoagregação em água, o que possibilita o uso destas como FS em TFDa (GEROLA, 2010). No entanto, Gerola et al. (2011a) alerta que, mesmo com a dissolução da CL em surfactantes, como o Tween 80 e o P-123, a formação de agregados não consegue ser completamente evitada, já que a presença da cadeia fitílica na molécula de CL influencia na habilidade do surfactante em manter as moléculas no estado monomérico. Dessa forma, a autoagregação que ocorre com a CL, mesmo com a utilização do Tween 80 e P-123, pode ser também uma das causas da sua baixa efetividade contra o microrganismo pesquisado neste estudo. Os autoagregados não são eficientes produtores de oxigênio singlete e por isso limitam a eficácia da TFDa.

Uma das explicações para a baixa ação fotodinâmica da CL como FS neste estudo pode ser relacionada à baixa proximidade entre os sítios biológicos alvo nos microrganismos e o local de geração das espécies oxidantes ativas, ou seja, do local em que se encontra o composto fotossensível. Segundo Soares (2006), o tempo de vida de espécies como o oxigênio singlete em tecidos biológicos é muito pequeno, o que restringe bastante o raio de ação ao redor do seu fotogerador. A CL é um FS aniônico e sua ação fotodinâmica contra bactérias gram-negativas pode ser dificultada, já que a carga negativa da CL não consegue união com a membrana externa carregada negativamente das espécies gram-negativas. No entanto, tem sido proposta por alguns pesquisadores que a afinidade de FS carregados negativamente para bactérias gram-negativas pode ser aprimorada através da união do FS com uma molécula catiônica, através do uso de agentes de membrana ativos, ou através da conjugação do FS com anticorpos monoclonais que se unem a antígenos específicos de superfície e conseguem atravessar a membrana (HAMBLIN; HASAN, 2004; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). De acordo com Tegos et al. (2006) e Kranz et al. (2011), a união de agentes fotossensibilizadores a sistemas carregadores especiais tem como finalidade direcionar o FS à região alvo, melhorar

o transporte e a interação com as células e facilitar a absorção e incorporação pelas membranas celulares bacterianas. Kranz et al. (2011) utilizaram o mTHPC, um FS hidrofóbico e aniônico enriquecido com um lipossoma com carga positiva. O lipossoma age na desestabilização da parede celular bacteriana, o que aprimora a absorção do corante pela célula e aumenta assim sua eficácia antibacteriana. Tegos et al. (2006) propuseram a união do FS clorina e6 com a PEI, já que este aumenta a permeabilidade da membrana externa bacteriana e, assim, auxilia na absorção do corante pela célula. Este veículo macromolecular é resistente à degradação pelas proteases e tem uma absorção lenta pelas células mamárias do hospedeiro. O conjugado covalente entre clorina e PEI se une eficientemente com bactérias gram-positivas e negativas e tem obtido excelentes resultados como FS na TFDa em infecções endodônticas (GARCEZ et al., 2007, 2008, 2010). George, Hamblin e Kishen (2009) propuseram a utilização de cátions divalentes, como os íons cálcio e magnésio, que quando presentes no meio extracelular aumentam a absorção de FS aniônicos por células bacterianas gram-negativas.

Gerola et al. (2011a) sugerem que a ação fotodinâmica da CL contra microrganismos possa ser aprimorada através da associação com lipídios carregados positivamente, como as vesículas lipossomais catiônicas, para dirigir a droga FS para o local alvo dentro das células. Este pode ser o próximo passo para os estudos que envolvem a ação da CL como FS na TFDa. Outra possibilidade é o estudo de outros derivados da CL, como o Pheo, Pheid, Zn-Chl e Cu-Chl, que também podem ser possíveis agentes fotossensibilizadores para a TFDa. Gerola et al. (2011a) pesquisaram alguns derivados da CL e observaram que Pheo e Pheid têm a vantagem da fotoestabilidade, que mantém constante a concentração do substrato durante a iluminação e mantém o nível da produção de oxigênio. No entanto, a ação destes derivados contra as bactérias pesquisadas ainda foi muito inferior, quando comparados com os FS mais utilizados em TFDa, como o TBO e o AM.

Segundo Gerola et al. (2011a), os derivados das porfirinas e das clorinas têm sido menos efetivos contra bactérias do que os corantes do grupo das fenotiazinas, como o AM e o TBO. A CL apresenta efeitos fotodinâmicos superiores contra células cancerígenas do que contra microrganismos. No entanto, a CL ainda não deve ser descartada como FS na TFDa devido aos muitos parâmetros que influenciam a

atividade fotodinâmica (GEROLA et al., 2011a). A CL e seus derivados, quando melhor formulados e estudados, podem vir a ser FS promissores na TFDa. A completa avaliação dos efeitos fotodinâmicos da CL em infecções endodônticas ainda requer conhecimento dos parâmetros de tratamento ótimos. Isto inclui a concentração ideal da CL e de seu solvente, o tempo de incubação da CL com os microrganismos antes da irradiação, além da densidade de poder e energia de fluência da luz utilizada para sua irradiação.

A TFDa é uma técnica não invasiva, que pode oferecer muitas vantagens quando aplicada associada ao tratamento endodôntico convencional: rápida aplicação da droga no canal radicular; rápida morte bacteriana após um tempo de tratamento relativamente curto; completa penetração do FS nos biofilmes e túbulos dentinários; penetração e citotoxicidade limitada do FS e da luz dentro dos ligamentos periodontais e ossos adjacentes; ausência de efeitos secundários térmicos nos tecidos circunvizinhos aos canais radiculares (SOUKOS et al., 2006). A TFDa não irá substituir a terapia química antimicrobiana, mas a abordagem fotodinâmica pode aprimorar o tratamento das infecções orais, acelerar e diminuir os custos do tratamento. O desenvolvimento de FS mais eficientes, sistemas de emissão de luz mais adequados e estudos posteriores são necessários para estabelecer os parâmetros de tratamento ótimos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O éter e o álcool de cereais não foram solventes adequados para a solubilização da CL. O Tween 80 e o P-123 foram os solventes mais eficientes para a solubilização da CL, pois não alteraram as suas propriedades e não causaram ação tóxica sobre o *E. faecalis*;
 - A CL apresentou uma baixa atividade fotodinâmica *in vitro* frente à bactéria *E. faecalis* e com irradiação pelo LED nos parâmetros utilizados;
 - O LED foi uma fonte de luz com um baixo potencial para a TFDa contra o *E. faecalis* sob os parâmetros utilizados neste estudo.
-

Referências

REFERÊNCIAS

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74(5):656-69.
- Agostiano A, Catucci L, Colafemmina G, Della Monica M, Scheer H. Relevance of the chlorophyll phytyl chain on lamellar phase formation and organisation. *Biophys Chem.* 2000;84(3):189-94.
- Amaral RR, Amorim JCF, Nunes E, Soares JA, Silveira FF. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. *RFO, Passo Fundo.* 2010;15(2):207-11.
- Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schauperl Z, Baraba A, Anić I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J.* 2013;46(4):339-47.
- Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J.* 2008;41:227–39.
- Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J.* 2006a;201(2):101-5.
- Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J.* 2006b;200(6):337-41.
- Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy SC, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in Necrotic Teeth Root Canals by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *Eur J Dent.* 2007;1(4):216-21.
- Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):443-9.
- Dickers B, Lamard L, Peremans A, Geerts S, Lamy M, Limme M, et al. Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci.* 2009;24(1):81-5.
-

Embleton ML, Nair SP, Cookson BD, Wilson M. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG–tin (IV) chlorin e6 conjugate. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50: 857–64.

Faria G, Nelson-Filho P, Freitas AC, Assed S, Ito IY. Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2005;13(4):351-5.

Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J*. 2005;38(6):372-80.

Fiedor L, Stasiek M, Myśliwa-Kurdziel B, Strzałka K. Phytol as one of the determinants of chlorophyll interactions in solution. *Photosynth Res*. 2003;78(1):47-57.

Fimble JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008;34(6):728-34.

Fonseca MB, Júnior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OV, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(3):209-13.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):782-7.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*. 2008;34(2):138-42.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod*. 2010;36(9):1463-6.

Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(4):93-8.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegós GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;39(1):59-66.

George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(6):788-95.

George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):734-40.

George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J BiomedOpt.* 2007;12(3):034029.

Gerola AP. Estudos Físico-Químicos de Derivados de Clorofila em Sistemas Homogêneos e Micro-Heterogêneos: Aspectos Fotofísicos, Fotodinâmicos e Fotoinativantes sobre Micro-Organismos [dissertação]. Maringá (PR): Faculdade de Química, Universidade Estadual de Maringá; 2010.

Gerola AP, Santana A, França PB, Tsubone TM, de Oliveira HP, Caetano W, et al. Effects of metal and the phytol chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol.* 2011a;87(4):884-94.

Gerola AP, Tsubone TM, Santana A, de Oliveira HP, Hioka N, Caetano W. Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. *J Phys Chem B.* 2011b;115(22):7364-73.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008;34(5):537-40.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):436-50

Jori G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996;36(2):87-93.

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

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

Kranz S, Guellmar A, Völpe A, Gitter B, Albrecht V, Sigusch BW. Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. *Lasers Surg Med*. 2011;43(3):241-8.

Lee WY, Park JH, Kim BS, Han MJ, Hahn BS. Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells in vitro. *Yonsei Med J*. 1990;31(3):225-33.

Li WT, Tsao HW, Chen YY, Cheng SW, Hsu YC. A study on the Photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6:1341-8.

Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, et al. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J*. 2009;54(2):108-14.

Limantara L, Koehler P, Wilhelm B, Porra RJ, Scheer H. Photostability of bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy. *Photochem Photobiol*. 2006;82(3):770-80.

Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med*. 2012;44(7):588-96.

Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J*. 2009;42(4):351-9.

Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod*. 2011;37(2):217-22.

Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod*. 2010;36(2):322-8.

Park YJ, Lee WY, Hahn BS, Han MJ, Yang WI, Kim BS. Chlorophyll derivatives – a new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice. *Yonsei Med J*. 1989;30(3):212-8.

Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):367-71.

-
- Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.* 2008;33(2):231-7.
- Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, de Souza CP, Rodriguez HM, Ribeiro MC. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):521-6.
- Poly A, Brasil JFW, Marroig PC, Blei V, Risso PA. Efeito antibacteriano dos lasers e terapia fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares. *Rev Odontol UNESP.* 2010; 39(4):233-9.
- Raab O. Über die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Zeit Biol.* 1900;39: 524-46.
- Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endodont J.* 2004;37:438–46.
- Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child (Chic).* 2007;74(2):118-23.
- Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EV. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(4):634-41.
- Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J.* 2002;35(3):268-74.
- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(2):95-101.
- Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol.* 2005;50(6):575-83.
- Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J.* 2006;17(2):144-8.
-

Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações, e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. Química Nova. 2002;25(5):801-807.

Soares RRS. Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica [dissertação]. Maringá (PR): Faculdade de Química, Universidade Estadual de Maringá; 2006.

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J Endod. 2006;32(10):979-84.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol 2000. 2011;55(1):143-66.

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.

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2010;36(2):292-6.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86-93.

Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. Mar Drugs. 2010;8(1):91-105.

Tavares WL, Neves de Brito LC, Teles RP, Massara ML, Ribeiro Sobrinho AP, Haffajee AD, et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. Int Endod J. 2011;44(3):225-35.

Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(4):1402-10.

Tessarolli V. Ação da Terapia Fotodinâmica (TFD) sobre biofilme dentário humano [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2010.

-
- Ulatowska-Jarza A, Zychowicz J, Holowacz I, Bauer J, Razikc J, Wieliczko A, et al. Antimicrobial PDT with chlorophyll-derived photosensitizer and semiconductor laser. *Med Laser Appl.* 2006;21:177–183.
- Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J.* 2010;43(11):978-87.
- Volpato LE, de Oliveira RC, Espinosa MM, Bagnato VS, Machado MA. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. *J Biomed Opt.* 2011;16(7):075004.
- Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench. Med. Wochenschr.* 1903; 47:2042–4.
- Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent.* 2006;34(6):363-71.
- Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy or oral infections. *Photochem Photobiol.* 2004;3:412-8.
- Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009;35(11):1567-72.
-