JESSICA LUCIA NEVES BASTOS

Análise da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* à Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT) com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC – ClAl).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo como exigência para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto.**

Co-orientador (a): **Prof. Dra. Márcia Nitschke.**

Versão Corrigida

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

B327a

Bastos, Jessica Lucia Neves
Análise da sensibilidade de Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus à Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT) com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC □ ClAl). / Jessica Lucia Neves Bastos; orientador Nivaldo Antonio Parizotto; coorientadora Márcia Nitschke. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Ftalocianina Cloro-Alumínio. 2. PACT. 3. Microrganismos. 4. PDT. I. Título.

Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia
EESC/FMRP/IQSC

JESSICA LÚCIA NEVES BASTOS
Título: "Análise da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* à Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT) com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC – ClAl)".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃ INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDAD DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovada em: 22/03/2013

PROF. DR. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO (ORIENTADOR) — Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
Resultado: APROVADA — Assinatura:

PROF. DR. EMERY CLEITON CABRAL CORREIA LINS — Universidade Federal do ABC - UFABC
Resultado: Aprovada — Assinatura:

PROFª. DRª. NATALIA MAYUMI INADA — Instituto Física de São Carlos - USP
Resultado: Aprovada — Assinatura:

PROFª. DRª. JULIANA FERREIRA STRIXINO — Universidade do Vale Do Paraíba - UNIVAP
Resultado: Aprovada — Assinatura:

PROFª. DRª. JANICE RODRIGUES PERUSSI — Instituto de Química de São Carlos - USP
Resultado: aprovada — Assinatura:

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro - São Carlos - SP - 13566-590
Telefone/Fax: (16) 3373-9586 - E-mail: bioeng@sc.usp.br

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais que, através do incrível mecanismo de herança genética, me passaram o dom e a paciência necessários para enfrentar as dificuldades da vida científica e acadêmica. Dedico a minha família que contribuiu para a minha formação como pessoa e me deram bases para chegar até aqui, com princípios e valores rígidos e bem fundamentados. A todos aqueles que em mim acreditaram e que de alguma forma me ajudaram, tanto profissional quanto pessoalmente nessa caminhada por vezes árdua e complicada.

AGRADEÇO:

A minha mãe e meu irmão pelas palavras de carinho, compreensão e apoio tão fundamentais durante a realização do projeto.

Profundos agradecimentos ao Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto por acreditar em minhas capacidades e à Profa. Dra. Márcia Nitschke por ter acreditado em minhas habilidades para desenvolver essa pesquisa e me abrir as portas de seu laboratório, possibilitando esse meu crescimento científico e acadêmico.

Agradeço aos amigos do Grupo de Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP pela orientação, disponibilidade de equipamentos e apoios tanto profissional quanto pessoal.

Aos professores e funcionários da Bioengenharia por toda atenção e orientação conferidas a mim, em especial aos professores Orivaldo L. da Silva e Nelson Ferreira da Silva Junior. Sinceros agradecimentos a Janete dos Santos pela paciência e dedicação.

Aos meus amigos pessoais cujo apoio e incentivo foram de fundamental importância para tornar essa jornada mais prazeirosa e menos cansativa.

Agradeço à CAPES pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste projeto de Doutorado, me possibilitando contribuir de maneira positiva para as grandes descobertas científicas desse país, e melhorando cada vez mais a qualidade de vida de todos os cidadãos que aqui residem. Receber um financiamento e bolsa de tal instituição não é somente um incentivo, mas também um meio de por em prática as teorias que circundam o meio acadêmico, visando sempre o bem estar social e uma maior interação universidade – cidadão. O financiamento CAPES possibilita a realização de sonhos e mostra que, com o esforço e estímulos adequados, sempre se consegue alcançar seus objetivos, mesmo que estes, em princípio, pareçam complicados e, até mesmo, impossíveis.

*“*Great spirits have often encountered violent

opposition from weak minds*”*.

Albert Einstein

RESUMO

BASTOS, J. L. N. **Análise da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* à PACT com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC – ClAl).** 2013. 109 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, São Carlos. 2013.

Úlceras são alterações que ocorrem na integridade da pele como consequência de lesões diversas, constituindo a dificuldade de sua cura um grave problema de saúde pública. A fototerapia com laser de baixa intensidade (LLLT), através de seus efeitos biomoduladores, vem sendo apontada como uma técnica prática, rápida e eficaz para esses casos. Entretanto, aplicações de LLLT podem, em alguns casos, estimular a proliferação de microrganismos patogênicos presentes na lesão, resultando numa piora da infecção e maior retardo no processo de reparo. Nesses casos, o uso de quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) pode ser uma alternativa. O presente estudo testou a eficácia da PACT com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl) e da LLLT na inativação de microrganismos, com uma dose energética adequada para não prejudicar o processo de cicatrização. Em biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* previamente cultivados por um período de 24h em microplacas de 24 e 96 poços, realizou-se etapa única de aplicação da fototerapia LLLT e PACT com 4 diferentes formulações para inativação de microrganismos: formulação vazia (ausência de fármaco fotossensível – FV), formulação catiônica vazia (com alteração em sua polaridade – FCV), formulação aniônica com fármaco fotossensível (apenas Ftalocianina Cloro-alumínio FC-ClAl – FAPc), formulação catiônica com fármaco fotossensível (FC-ClAl + formulação com polaridade alterada – FCPc). Foram feitas análises quantitativas através da contagem de células viáveis e medidas de absorbância em leitora de ELISA com sal tetrazólio, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), associado. Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos permitiram concluir que a PACT com FC-ClAl sozinha (FAPc) não apresenta ação bactericida satisfatória sobre a *P. aeruginosa* e a *S. aureus*, mostrando resultados estimulatórios a esses microrganismos quando comparada às outras 3 formulações utilizadas. A ação antimicrobiana só foi observada ao se ter a associação da PACT Ftalocianina cloro-alumínio com a formulação catiônica (FCPc), a qual mostrou intensa interação com os biofilmes microbianos, principalmente com a *S. aureus*, mesmo na ausência de Ftalocianina (FCV).

Palavras-Chave: PACT, PDT, Ftalocianina Cloro-Alumínio.

ABSTRACT

BASTOS, J. L. N. **Sensitivity Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to PACT with a phthalocyanine-derived photosensitizer.** 2013. 109 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, São Carlos. 2013.

Ulcers are changes on the skin integrity as a consequence of several lesions, and its cure represents a serious public health problem. Phototherapy based on low level laser therapy (LLLT), through its biomodulatory effects, has been pointed as a fast, practical and effective therapy for these cases. However, LLLT applications may, in some cases, stimulate pathogenic microorganisms proliferation present in the lesion, resulting in a worst infection and longer delay on the healing process. For such cases the use of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) can be an alternative. The present study tested the PACT effectiveness with a phthalocyanine-derived photosensitizer and LLLT on microorganism inactivation, with an adequate energy dose in order to not damage all the healing process. On *P. aeruginosa* and *S. aureus* mature biofilms, previously cultivated for a period of 24h in 24 and 96 wells-plate, a single application of phototherapy based on LLLT and PACT to inactivate bacteria was performed, with four different formulations: blank formulation (FV – no photosensitive drug), cationic empty formulation (FCV – formulation with an inverted polarity), formulation with anionic photosensitive drug (FAPc – only Chloro-aluminum Phthalocyanine) and cationic formulation with photosensitive drug (FCPc - Chloro-aluminum Phthalocyanine associated with an inverted polarity formulation). Quantitative analyses were performed through the counting of colony forming units (CFU) and the absorbance analysis with MTT associated. The data were compared through variance analysis test (ANOVA), with a confidence level of 95%. The results showed that PACT with Chloro-aluminum Phthalocyanine itself does not present satisfactory bactericidal effect against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. This photosensitizer (FAPc) presented a microorganism stimulatory action when compared with the other three formulations used. The bactericidal effect was seen only with the PACT with cationic formulation association, which demonstrated an intense interaction with microbial biofilms, especially with *S. aureus*, even in the absence of Phthalocyanine (FCV).

Key-words: PACT, PDT, Chloro-aluminum Phthalocyanine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Ftalocianina	28
Figura 2: Ilustração esquemática do desenvolvimento de um biofilme bacteriano	34
Figura 3: Placa de Petri com as diferentes distribuições das UFC, método da gota.	42
Figura 4: Aspecto geral das microplacas de 96 poços após acréscimo de MTT para posterior leitura da absorbância dos grupos experimentais em leitora de ELISA.	45
Figura 5: Aspecto macroscópico do biofilme microbiano após os 45 minutos de contato com a FAPc.	48
Figura 6: Aspecto macroscópico do biofilme microbiano de *P. aeruginosa* após os 45 minutos de contato com a FCPc	48
Figura 7: Aspecto macroscópico do biofilme microbiano de *S. aureus* após os 45 minutos de contato com a FCPc	49
Figura 8: Gráfico com as médias e desvios padrão das medidas de absorbância referente aos grupos experimentais com *P. aeruginosa*.	55
Figura 9: Gráfico com as médias e desvios padrão das medidas de absorbância referente aos grupos experimentais com *S. aureus*.	56
Figura 10: Gráfico de comparação das médias e desvios padrão entre os grupos experimentais com *P. aeruginosa* de 24h e 72h.	66

Figura 11: Gráfico de comparação das médias e desvios padrão entre os grupos experimentais com *S. aureus* de 24h e 72h. 68

Figura 12: Aspecto macroscópico do biofilme microbiano após os 45 minutos de contato com a – formulação vazia (FV). 72

Figura 13: Aspecto microscópico do biofilme de *P. aeruginosa* após os 45 minutos de contato com a FAPc. 72

Figura 14: Aspecto macroscópico do biofilme de *P. aeruginosa* após os 45 minutos de contato com a FCPc. 73

Figura 15: Aspecto microscópico das amostras de *P. aeruginosa* após serem submetidas à PACT com a formulação contendo Ftalocianina aniônica (APc). 74

Figura 16: As figuras acima mostram o aspécto microscópico das amostras de *P. aeruginosa* após serem submetidas à PACT com a formulação contendo Ftalocianina catiônica (CPc). 75

Figura 17: Observar a ausencia de alteração no biofilme microbiano de *S. aureus* após os 45 minutos de contato com a FAPc, tanto na visão macroscópica da amostra quanto na microscopia com luz branca nos aumentos de 10x, 50x e 100x. 76

Figura 18: Aspecto microscópico e macroscópico dos grupos experimentais com *S. aureus*, evidenciando uma intensa aglutinação/granulação do biofilme após 45 minutos de contato com FCPc. 77

Figura 19: As imagens mostram o aspecto microscópico das amostras de *S. aureus* após serem submetidas à PACT com a formulação contendo Ftalocianina aniônica (APc). 78

Figura 20: As figuras mostram o aspecto microscópico das amostras de *S. aureus* após serem submetidas à PACT com a formulação contendo Ftalocianina catiônica (CPc). 79

Figura 21: A figura traz o gráfico de espectroscopia de absorbância das amostras de *P. aeruginosa* com Ftalocianina aniônica e catiônica (APc e CPc), e do respectivo grupo controle (C). 81

Figura 22: A figura traz o gráfico de espectroscopia de absorbância das amostras de *S. aureus* com Ftalocianina aniônica e catiônica (APc e CPc), e do respectivo grupo controle (C). 82

Figura 23: Estrutura química do Azul de Toluidina (TBO) 86

Figura 24: Estrutura química do Azul de Metileno (MBO) 87

LISTA DE TABELAS

Tabelas 1 e 2: Média e desvio padrão dos grupos experimentais irradiados com laser 35J/cm^2.	50
Tabelas 3: Média e desvio padrão dos grupos experimentais pré e pós-lavagem dos poços da microplaca de 96 poços.	51
Tabelas 4: Média e desvio padrão dos grupos experimentais pré e pós-lavagem dos poços da microplaca de 96 poços.	52
Tabela 5: Comparação entre os grupos pré e pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *P. aeruginosa*	53
Tabela 6: Comparação entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *P. aeruginosa*	54
Tabela 7: Comparação entre os grupos controles pré e pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *S. aureus*	54
Tabela 8: Comparação entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *S. aureus*.	54
Tabelas 9: Média e desvio padrão dos grupos experimentais.	60
Tabelas 10: Média e desvio padrão dos grupos experimentais.	61
Tabela 11: Comparação estatística entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle negativo de *P. aeruginosa*, levando-se em consideração os valores obtidos após as medidas de absorbância, na presença de MTT.	63

Tabela 12: Comparação estatística entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle negativo de *S. aureus* levando-se em consideração os valores obtidos após as medidas de absorbância, na presença de MTT 63

Tabela 13: Médias e desvios padrão das medidas de absorbância nos grupos experimentais com *P. aeruginosa* em biofilmes de 24h e 72h, após serem submetidos aos procedimentos experimentais. 67

Tabela 14: Médias e desvios padrão das medidas de absorbância nos grupos experimentais com *S. aureus* em biofilmes de 24h e 72h, após serem submetidos aos procedimentos experimentais. 69

Tabela 15: ***Pseudomonas aeruginosa*** (24h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2. 69

Tabela 16: ***Pseudomonas aeruginosa*** (72h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2. 70

Tabela 17: ***Staphylococcus aureus*** (24h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2. 70

Tabela 18: ***Staphylococcus aureus*** (72h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2. 70

Apêndice A: Parâmetros de Biossegurança para uso do laser/LED 106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PDT: Terapia Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Therapy)

PACT: Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês Photodynamic Antimicrobial Chemical Therapy)

LLLT: Terapia Laser de Baixa Intensidade (do inglês, Low Level Laser Therapy)

C: Controle

CL: Controle laser

FV: Formulação vazia

FCV: Formulação catiônica vazia

FAPc: Formulação aniônica com fármaco fotossensível

FCPc: Formulação catiônica com fármaco fotossensível

MCL: Microscopia confocal a laser

UFC: unidades formadoras de colônias

FC: Ftalocianina

FC – ClAl: Ftalocianina cloro-alumínio

PACT / FC-ClAl: Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Ftalocianina cloro-alumínio

AMP: Peptídeos antimicrobianos (do inglês, Antimicrobian Peptides)

CAMP: Peptídeos antimicrobianos catiônicos (do inglês, Cationic AMP)

EPS: Polissacarídeo extracelular (do inglês, Extracellular PolySaccharides)

MTT: sal 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazólio: Amresco

BHI: Brain Heart Infusion

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 19

Úlceras 19

Laser 21

Terapia Fotodinâmica (PDT) 27

Fotossensibilizadores 28

Tensoativos 33

Biofilmes e Microrganismos 34

Objetivos 39

MATERIAIS E MÉTODOS 40

Microrganismos 41

Fototerapia (LLLT) 41

Fármacos 42

Métodos de Análises 42

Condições de cultivo 44

Procedimentos Experimentais 45

Descarte do Material 47

Análise Estatística 47

RESULTADOS E DISCUSSÕES 47

Etapa 1 49

Etapa 2 61

Etapa 3 67

Etapa 4 74

DISCUSSÃO GERAL 85

CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 99

APÊNDICE 108

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

- **Úlceras**

As úlceras são alterações que ocorrem na integridade da pele, constituindo um sério problema de saúde, em razão da dificuldade de cura das mesmas e do elevado número de sujeitos acometidos, onerando, desta forma, os gastos públicos para oferecer tratamento adequado e eficiente aos pacientes. Embora os registros clínicos desses casos sejam escassos, sabe-se que é grande o número de indivíduos acometidos, assim como a dificuldade de recuperação dessas patologias [1].

Dentre os diversos tipos de tratamentos existentes, o laser de baixa intensidade (LILT) vem sendo apontado como um recurso eficaz para uma boa cicatrização de úlceras tanto agudas quanto crônicas [2]. Efeitos como aumento do fluxo e volume sanguíneo na área lesada, redução do número de células inflamatórias, estímulo da produção de fatores de crescimento, angiogênese, proliferação fibroblástica com consequente deposição de colágeno, resultando em um aumento na velocidade de cicatrização da lesão, fazem do laser um grande aliado em casos de recuperação de úlceras crônicas [3].

Um dos fatores apontados como retardantes do processo de cicatrização de lesões cutâneas é a presença de microrganismos patogênicos que interferem no processo de reparo por liberarem, na área lesada, toxinas capazes de degradar os peptídeos antimicrobianos (AMP's) presentes na superfície epitelial, prejudicando a cicatrização e favorecendo a proliferação das bactérias [4]. Fototerapias baseadas em aplicações de laser, em alguns casos, ao invés de inativar, estimulam a proliferação dos microrganismos irradiados, resultando numa piora da infecção e, consequentemente, em maior retardo no processo de reparo da lesão [5; 6]. Para esses casos existe a

“Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana” (PACT – Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy), a qual utiliza substâncias/fármacos fotossensíveis (FS) capazes de determinar a inativação de alguns microrganismos ao serem irradiados pela luz laser. Ao serem ativadas pela luz, na presença de oxigênio, essas substâncias liberam radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a uma destruição e eliminação tecidual através de um processo de necrose e/ou apoptose [7; 8; 9]

Os derivados de Ftalocianina (FC) representam substâncias fotossensíveis comumente utilizadas para eliminação de tecidos tumorais [10; 11; 12; 13; 14; 15], apresentando uma faixa ótima de fotoativação entre 680 – 700 nm. Sua ação sobre a proliferação fibroblástica foi demonstrada no trabalho de Silva et al. (2004)[16] onde PDT com FC-ClAl (685 nm) em feridas de ratos resultaram em um aumento da re-epitelização e grande presença de colágeno no sítio de lesão, não levando a crer que esse tipo de tratamento tenha causado qualquer dano ao processo de cicatrização. Desta forma, tendo-se resultados positivos quanto à utilização desse fármaco para o reparo tecidual, questiona-se qual seria a ação da FC-ClAl ao se ter, na lesão, a presença de microrganismos patogênicos. A ação inibitória dessa substância em relação às bactérias comumente presentes em úlceras abertas representaria uma grande vantagem, pois se teria, ao mesmo tempo, a desinfecção da lesão associada ao estímulo da proliferação fibroblástica.

Trabalhos como o de Mendez et al. (2004)[17] demonstram que quando se almejam efeitos bioestimulatórios positivos no processo de reparo de úlceras cutâneas, o uso da LILT com comprimentos de onda entre 830nm e 685nm é considerado um recurso eficaz. Desta forma, percebe-se uma grande vantagem de aplicações de luz na faixa do vermelho e do infravermelho próximo quando se objetiva uma cicatrização mais rápida e eficaz das lesões cutâneas. Entretanto, na presença de diferentes microrganismos patogênicos numa mesma lesão, esse efeito

pode não ser satisfatório devido à possível ação estimulatória do laser nesses comprimentos de onda sobre alguns tipos de microrganismos. A ação estimulatória da luz poderia determinar um maior retardo do reparo da lesão por estimular também a proliferação bacteriana. A existência de um FS (corante) capaz de inativar esses microrganismos resistentes à simples aplicação de luz, combinada com a ação estimulatória do laser, nos limites do vermelho e do infravermelho próximo, sobre o processo cicatricial, representaria uma real vantagem para aplicações clínicas em casos de úlceras crônicas (multi) contaminadas e resistentes a medicamentos sistêmicos. Desta forma, ter-se-ia uma desinfecção associada a um aumento na velocidade de cicatrização da lesão.

- **Laser**

Acrônimo para "*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation"* (Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada de Radiação), LASER significa uma fonte de luz coerente de um feixe estreito monocromático nas faixas visível, infravermelho e ultravioleta do espectro. Os diversos tipos de lasers diferem entre si pelo comprimento de onda e pela natureza do meio ativo [18; 19]. Esse tipo de luz apresenta características específicas que as diferem das demais, tais como:

- Monocromaticidade: a luz emitida apresenta apenas um comprimento de onda [20; 21].
- Coerência: em uma radiação laser temos não só um único comprimento de onda, mas também picos e vales (depressões) dos campos elétricos e magnéticos ocorrendo ao mesmo tempo (coerência temporal) e "viajando" numa mesma direção (coerência espacial).

- Colimação: os feixes de laser permanecem sempre paralelos em consequência da coerência espacial, o que resulta em uma inexistência de divergência da radiação durante sua propagação ao longo de grandes distâncias [20; 22].

A luz laser interage com os tecidos biológicos igualmente às outras radiações eletromagnéticas equivalentes, através dos fenômenos da reflexão, refração, dispersão e absorção. As diferenças dependem das características do tecido em questão, do ângulo de aplicação da radiação (ângulo de incidência) e do comprimento de onda [18; 20]. Uma absorção máxima da radiação é conseguida através de uma aplicação em contato direto com o tecido, a um ângulo de 90° (ângulo reto). Dessa forma, teremos uma redução significativa da reflexão e da dispersão, tornando o tratamento mais eficaz, já que cerca de 5% a 7% da radiação incidente é refletida pela pele em casos de aplicações feitas em outros ângulos que não o reto [23].

Uma vez que o laser penetra nos substratos subsequentes (93% a 97%), ele se dispersa através da reflexão interna, refração e divergência, sendo suas proporções dependentes do comprimento de onda e das características do tecido tratado. Desta forma, diz-se que o grau relativo de absorção e dispersão só depende do tipo de tecido através do qual a luz está passando, já que esse tipo de luz, ao penetrar, perde rapidamente a sua coerência devido ao alargamento dos feixes, provocado pela grande variabilidade de índices refrativos existentes nos componentes do tecido em questão [20; 21].

A penetração e a absorção dos feixes luminosos pelos substratos sofre interferência também da chamada especificidade das biomoléculas absorventes, as quais diferem umas das outras quanto ao seu espectro de absorção (comprimento de onda capaz de absorver). A especificidade dessas biomoléculas é determinada pela presença de moléculas orgânicas fotorreceptoras, tendo-

se a evidência de que comprimentos de onda entre 400 nm e 700 nm da luz laser visível são altamente absorvidos pela melanina, hemoglobina e mioglobina [24; 25].

Ao se ter a absorção da luz com um determinado comprimento de onda pelas moléculas fotorreceptoras, estas adotam um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários, desencadeando efeitos biológicos específicos em determinadas circunstâncias [26].

De acordo com Kitchen & Partridge (1991) [27] o efeito da LLLT na cicatrização está relacionado ao aumento de macrófagos, degranulação de mastócitos, angiogênese, aumento da atividade fagocitária e fotodissociação de oxihemoglobina. Outros efeitos conseguidos através da irradiação laser estão relacionados ao favorecimento da liberação de fatores de crescimento, promoção do aumento da síntese de ATP, produção de ácidos nucléicos (DNA e RNA) devido aumento dos níveis de AMPcíclico, o que promove um aumento da mitose celular, aumento significativo no número de fibroblastos e ativação da síntese proteica [28; 29].

A intensidade da fotorresposta das células que receberam radiação laser não está relacionada com o fenômeno do “tudo ou nada”, podendo estas responder aos estímulos de luz em vários graus. Desta forma, diz-se que a fotorresposta está relacionada ao estado fisiológico prévio da célula, ou seja, no caso de culturas celulares, fatores como disponibilidade de nutrientes, idade da cultura, baixa concentração de oxigênio e queda do pH, causam alterações do estado redox celular, influenciando a resposta biológica à irradiação. A resposta celular será baixa ou ausente quando o seu redox é ótimo (célula normal), e alta ou forte quando o mesmo se encontra alterado (célula lesada) [30; 31].

As respostas possíveis de serem desencadeadas pela LLLT podem ser didaticamente divididas em 2 grupos: efeitos a *curto prazo* ou diretos, onde os efeitos podem ser observados

poucos segundos ou minutos após a aplicação da radiação, e efeitos a *longo prazo* ou indiretos, que podem ser observados horas ou dias após o fim da irradiação [32].

Dentre os efeitos a *curto prazo* temos:

- Liberação de substâncias pré – formadas:

A irradiação estimula a liberação de substâncias como a serotonina, a bradicinina e a histamina, as quais já estavam formadas no organismo.

- Aumento da proliferação celular:

A radiação ativa a cadeia respiratória gerando um gradiente de prótons na membrana mitocondrial, que atua como um sinal iniciador para a proliferação celular.

- Presença de mitocôndrias gigantes:

Manteifel *et al*. (1997) [33] irradiaram linfócitos humanos com laser He – Ne (632,8 nm) e observaram que houve mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas mitocondriais externas, determinando uma fusão de mitocôndrias adjacentes levando, desta forma, ao aparecimento de mitocôndrias gigantes. Essas, por sua vez, são capazes de proporcionar altos níveis de energia de reposição.

- Aumento do ATP mitocondrial:

Evidências mostradas no trabalho de Passarella *et al*. (1984) [34] , no qual mitocôndrias de hapatócitos *in vitro* foram irradiadas por laser He – Ne a 5 J/cm², levam a crer que tal processo está intimamente relacionado à transferência de elétrons na cadeia mitocondrial, onde um potencial extra – eletroquímico, gerado através de um mecanismo ainda desconhecido, é finalizado com uma síntese maior de ATP. Preconiza-se também que o laser possivelmente atua

diretamente na permeabilidade celular, facilitando a mobilidade dos íons cálcio, sódio e potássio (Ca^+, Na^+, K^+) e aumentando indiretamente a produção de ATP, visto que a energia liberada pela hidrólise do ATP permitirá o correto funcionamento da bomba de sódio e potássio.

São vários os efeitos a *longo prazo* da irradiação, sendo os 3 principais:

- Efeito anti – inflamatório:

Mesmo ainda não se sabendo claramente o mecanismo de ação sobre um processo inflamatório, fototerapias de baixa intensidade têm sido amplamente utilizadas como tal. Nesses casos, sua ação tem como base a promoção de efeitos como: [32; 35]

- inibição de fatores quimiotáticos característicos das primeiras etapas da lesão.
- alteração da permeabilidade vascular reduzindo, desta forma, o volume de exsudato.
- normalização da permeabilidade de membrana.
- interferência com diversos efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação.

- Efeito analgésico:

A inflamação e a dor são diminuídas através da aplicação de LILT devido à promoção da reabsorção de exsudatos inflamatórios, o que favorece a eliminação de substâncias algogênicas (bradicinina, histamina e acetilcolina), e também determina uma elevação do limiar de dor nos nervos periféricos, levando a um bloqueio na despolarização das fibras aferentes tipo C (fibras condutoras de estímulos dolorosos) [36; 37].

Desta forma, percebe-se o quão vantajoso é a associação da fototerapia laser para determinar uma cicatrização rápida e eficaz de úlceras dérmicas, tornando de fundamental importância a associação deste método com uma técnica que seja também capaz de levar a uma inativação

microbiana, agentes esses comumente encontrados nesse tipo de lesão.

- **Terapia Fotodinâmica PDT**

A Terapia Fotodinâmica (PDT – do inglês Photodynamic Therapy) é uma técnica amplamente utilizada para o tratamento médico oncológico, sendo atualmente muito empregada também em tratamentos odontológicos para o controle microbiológico das afecções bucais. Esse termo foi primeiramente utilizado em 1900, quando Von Tappeiner & Raab observaram, acidentalmente, que microrganismos foram mortos ao ser cultivados em meio de cultura contendo acridina diluída e, posteriormente, expostos à intensa luz de raios durante uma tempestade. Mais tarde, em 1907, os mesmos autores passaram a descrever tratamentos de tumores dérmicos através da combinação de eosina, aplicada topicamente, com irradiação de luz branca. Eles postularam, na época, que algum produto da fluorescência, e não somente a luz, seria o real responsável pela elevada toxicidade que levou à eliminação do tecido tumoral [38; 39].

Esse tipo de terapia baseia-se em uma reação fotoquímica oxigênio dependente, onde a ativação de um corante, conhecido como fotossensibilizador, se dá através de uma luz visível de comprimento de onda específico, determinando a formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente o oxigênio singleto ou radicais livres, que são tóxicos ao tecido alvo, levando a uma destruição tecidual ou morte microbiana por um processo de necrose e/ou apoptose. A predominância da apoptose ou da necrose está relacionada ao tipo de FS utilizado [40; 41].

A energia luminosa é absorvida pelo corante, produzindo substâncias altamente reativas que levam à morte celular, podendo esta ocorrer através de 2 tipos de reações: tipo I e tipo II. Na reação tipo I há a transferência de energia do fotossensibilizador excitado para um substrato oxidável através de elétrons ou átomos de hidrogênio, gerando um radical no substrato semi-oxidado e no corante semi-reduzido. As reações subsequentes de ambos com o hidrogênio

determinam a formação de um substrato oxidado e a formação de espécies reativas de oxigênio [42].

A reação tipo II o estado tripleto do fotossensibilizador transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental. Desta forma, tem-se como molécula resultante o oxigênio singleto que é um poderoso agente oxidante, altamente tóxico para as células. As reações seguintes no meio biológico resultam em uma inativação das células atingidas através de reações de oxido redução com lipídeos da membrana celular, ácidos nucléicos e proteínas [43].

A PDT é uma técnica vantajosa também para a inativação de microrganismos patógenos por apresentar amplo espectro de ação, ausência de eleitos colaterais severos, baixo potencial mutagênico, ser uma terapia específica à célula alvo, não prejudicando tecidos adjacentes, início de sua ação tóxica apenas após exposição à luz com comprimento de onda adequado e não favorecimento da seleção de cepas resistentes, fato esse muito comum com o uso indiscriminado de antibióticos [44; 45].

- **Fotossensibilizadores**

Os fotossensibilizadores (FS), ou corantes, são fármacos fotossensíveis utilizados na terapia fotodinâmica (PDT), cuja ação combinada com a presença da luz e de oxigênio, resulta na produção de oxigênio tóxico (singlete / ROS) e radicais livres, os quais levam à destruição do tecido alvo por um mecanismo de necrose e/ou apoptose [46; 47]. A toxicidade dessas substâncias está relacionada com a dose, via de administração, absorção, seletividade e biodistribuição do FS, assim como tipo de luz, irradiância, dose, disponibilidade de oxigênio na célula, e intervalo entre a administração do FS no tecido alvo e a aplicação da luz [48; 49].

Um FS considerado como adequado e ideal para aplicações clínicas deve apresentar as seguintes características: [50]

- ✓ baixa citotoxidade
- ✓ fotossensibilidade não prolongada
- ✓ alta estabilidade, reprodutibilidade e simplicidade na sua formulação
- ✓ rápida eliminação pelo organismo
- ✓ seletividade, alta afinidade e penetração com o tecido alvo
- ✓ longa duração do estado triplete excitado
- ✓ apresentar absorção molar na chamada "janela fototerapêutica" que vai de 600 – 850 nm para uma boa penetrabilidade da luz
- ✓ alto rendimento quântico do estado triplete
- ✓ alto rendimento quântico de geração do oxigênio singlete
- ✓ baixo rendimento de degradação do cromóforo

As ftalocianinas (FC) (Figura 1) são fotossensibilizadores classificados como de segunda geração, e apresentam grande lipofilicidade, o que implica em dizer que se ligam facilmente à membrana plasmática, microssomos e mitocôndrias [51]. São compostos estáveis, não tóxicos, com elevada seletividade e boa penetrabilidade celular. Sua taxa ótima de absorção no espectro localiza-se na faixa que vai do vermelho (680nm) ao infravermelho próximo (850nm), sendo seu mecanismo de ação relacionado com o sistema Fas-FasLigante [52]. O Fas é uma proteína receptora de membrana que pertence à família dos chamados fatores de necrose tumoral (TNF), os quais, quando expressos (presença do FasLigante), determinam a morte programada da célula (apoptose) [53; 54]. Análises imuno-histoquímicas realizadas após PDT com ftalocianina de zinco

(FCZn) demonstraram uma considerável imunoexpressão de Fas na membrana celular dos tecidos tratados [55].

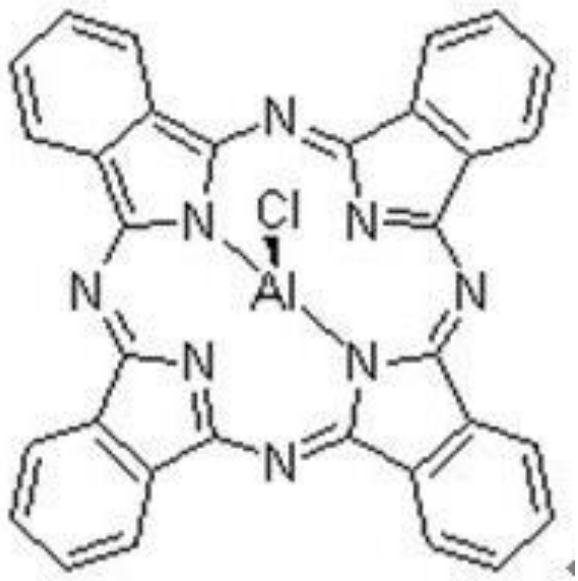

Figura 1: Estrutura da Ftalocianina cloro-alumínio (Fonte: portuguese.alibaba.com/product-gs/aluminum-phthalocyanine-chloride-14154-42-8-521654467.html).

Apesar de serem várias as pesquisas realizadas com a FC objetivando a destruição de tecidos, principalmente os tumorais [10; 14; 15; 54], este fármaco pode também ser utilizado para propiciar estímulo fibroblástico, com consequente reparo de lesões. Jiang et al (2004)[56] afirmam que a PDT é capaz de estimular a produção de VEGF, resultando em um aumento na angiogênese e uma maior proliferação celular, não se tendo uma destruição tecidual característica de um tratamento tumoral. Ao trabalhar com PDT utilizando a FC cloro-alumínio e laser 685nm, Silva et al (2004)[16] constataram um aumento na re-epitelização e na deposição de colágeno no sítio da lesão epitelial em ratos. Desta forma, percebe-se que a ação proliferativa ou eliminatória da PDT está relacionada à concentração do FS nas células e à intensidade do estímulo luminoso aplicado. Tal constatação torna viável o uso da ftalocianina cloro-alumínio objetivando tanto uma inativação de

microrganismos, quanto estimulo da proliferação fibroblástica. Para isso, será necessário trabalhar principalmente com o tempo entre a administração do FS e a aplicação da fototerapia, objetivando alcançar diferentes concentrações desse fármaco nas bactérias e células fibroblásticas, visando atingir diferentes resultados com apenas uma técnica, a PACT / FC-ClAl.

Tendo-se em vista que fotossensibilizadores catiônicos, assim como visto nos peptídeos antimicrobianos CAMP's, são capazes de determinar uma rápida associação dessas substâncias com a carga negativa de estruturas presentes na maioria das paredes celulares das bactérias, optou-se por realizar testes com a associação entre a FC-ClAl e uma substância catiônica, objetivando verificar se houve uma maior ou menor ação bactericida do fármaco em questão.

- **Fotossensibilizadores Catiônicos**

Atualmente, sabe-se que fotossensibilizadores catiônicos são capazes de determinar uma rápida associação de substâncias com a carga negativa de estruturas presentes na maioria das paredes celulares das bactérias tanto Gram (+) e Gram (-) (ácidos teitoicos e fosfolipídios, p.e.), levando a uma considerável redução na resistência desses microrganismos [57]. Tal mecanismo é também observado em situação real nos organismos vivos, onde peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMP) apresentam uma maior eficácia do que os não catiônicos (AMPs) no sistema imunológico do indivíduo.

Peptídeos antimicrobianos (AMP's) são moléculas produzidas pelos organismos vivos ao serem invadidos por microrganismos patogênicos externos, como parte da reposta imune [58; 59]. Seu mecanismo de ação envolve uma série de reações que levam à formação de pequenos poros

na membrana celular das bactérias, vírus ou fungos, resultando em uma completa ruptura dessa estrutura [60]. As AMP's têm sido consideradas como uma alternativa menos agressiva ao organismo para o desenvolvimento de novos antibióticos naturais. Entretanto, alguns microrganismos foram capazes de desenvolver mecanismos de defesa contra esses peptídeos, através de toxinas que degradam as AMP's, possibilitando sua proliferação e aumento do dano ao organismo hospedeiro [4].

Naturalmente à resposta imune, há também a presença de peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMP's), que são estruturas geralmente pequenas, anfipáticas e positivamente carregadas, o que facilita a sua ligação com a membrana ou parede celular dos microrganismos. Sua ação ainda não foi muito bem definida, mas acredita-se que há um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, levando a um extravasamento dos componentes citoplasmáticos, com consequente eliminação do agente patógeno. Apesar desse mecanismo ser apontado como mais eficaz do que as AMP's contra os microrganismos, algumas espécies de bactérias foram capazes de desenvolver um meio de defesa contra esses peptídeos catiônicos. Considerado um recurso mais "sofisticado" do que as toxinas contra as AMP's, essa defesa envolve mudanças na expressão gênica, o que resulta em uma redução da carga negativa presente na superfície celular bacteriana, dificultando o acoplamento das CAMP's e sua consequente eliminação [61].

Entretanto, peptídeos catiônicos não só apresentam efeitos positivos no processo de resposta imune, mas também apresentam efeitos tóxicos ao próprio organismo. Em condições normais, *in vivo*, as CAMP's apresentam uma carga entre +4 e +6, o que representa uma carga positiva ótima de atividade [62] Em contrapartida, alguns estudos realizados até o momento mostraram que um aumento nessa carga de +3 a +5 leva a uma maior eficácia das CAMP's contra bactérias tanto

Gram (+) como Gram (-), mas determinam, também, uma atividade hemolítica indesejada [62; 63; 64]. Esse efeito indesejado evidencia a necessidade de um maior cuidado ao se buscar uma ação bactericida contra uma ampla gama de microrganismos baseada apenas no aumento da cationicidade das substâncias/fármacos, já que se o aumento for muito alto, a ocorrência de hemólises pode levar a uma piora generalizada no organismo de um indivíduo hospedeiro.

Tendo em vista a real vantagem da presença de uma carga positiva para a eficácia das substâncias, optou-se por realizar testes com a associação entre a FC-ClAl e uma substância catiônica, objetivando verificar se houve uma maior ou menor ação bactericida do fármaco em questão.

- **Tensoativos**

Dentre as várias substâncias que podem ser associadas ao fotossensibilizador para aumentar sua eficácia, tem-se os tensoativos, também conhecidos como surfactantes - moléculas anfipáticas (uma região hidrofílica e outra hidrofobia) com atividade superficial e capacidade emulsificante, que atuam na interface entre duas fases de diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial. [65; 66; 67]. Estas propriedades fazem dos tensoativos substâncias importantes e versáteis, apresentando inúmeras aplicações como atuar como detergentes, emulsificantes, lubrificantes, espumantes, dispersantes e solubilizantes.

A associação de tensoativos com a FC-ClAl seria de grande importância já que suas propriedades detergentes atuariam como um coadjuvante para a eliminação eficaz de microrganismos, além de otimizar o processo de fotoativação da mesma uma vez que evita a ocorrência da “agregação” das moléculas, permitindo uma melhor interação com a luz laser.

Alguns complexos de Ftalocianina tendem, quando em solução, a formar agregados inativos que diminuem a eficácia da substância por prejudicarem a penetração da luz irradiada. Desta forma, se faz necessária a associação de alguns grupos (p.e. tensoativos) que influenciam nas suas propriedades, impedindo a formação de agregados inativos, otimizando todo o processo de obtenção de resultados positivos com a PACT / FC-ClAl.

- **Biofilmes e Microrganismos**

O principal fator apontado como possível responsável pela resistência bacteriana aos medicamentos tópicos, em caso de úlceras, é a presença de biofilmes. Essa estrutura porosa e altamente hidratada é composta por uma matriz predominantemente aniônica de exopolímeros bacterianos e macromoléculas exógenas, os exopolissacarídeos (EPS), que mantém os microrganismos agregados a uma superfície sólida. Essas microcolônias heterogêneas protegem as bactérias contra a ação de macrófagos, além de oferecerem resistência aos antibióticos, por dificultarem a penetração dos agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, impossibilitando sua eliminação de maneira eficaz [68; 69; 70].

Os primeiros indícios de descoberta dos biofilmes datam de 1674, quando Antony Van Leeuwenhoek observou, com o auxílio de um microscópio simples, a presença de uma colônia de "animáculos" na placa de seu dente [71; 72]. Entretanto, apenas no século vinte é que estudos sobre essa complexa estrutura começaram a ser realizados, sendo que as descobertas mais significativas foram conseguidas através da microscopia eletrônica [73].

De maneira geral, as bactérias apresentam 2 formas distintas de comportamento: a planctônica, ou livre, e o estado aderido ou séssil [72], sendo estimado que aproximadamente 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes (aderido), pois esta lhes confere uma maior

chance de sobrevivência [68].

O biofilme bacteriano apresenta 5 estágios de formação [74; 75]: (Figura 2)

- Aderência inicial das células microbianas: sobre uma superfície de contato previamente exposta a substâncias / fluidos que formam uma camada condicionante sobre o material em questão (implantes, leito de feriadas, equipamentos hospitalares, canos de água ou refrigeração, entre outros), as bactérias planctônicas (livres) se aderem, inicialmente, de maneira reversível.
- Produção do polissacarídeo extracelular (EPS): nessa etapa, tem-se a aderência irreversível nos microrganismos à superfície de contato, dando-se início à multiplicação celular, atuando o EPS, formado por proteínas, polissacarídeo e ácidos nucléicos, como uma "cola" que agrupa as células bacterianas.
- Desenvolvimento da arquitetura externa do biofilme: definição da forma tridimensional de "cogumelo" comumente visualizada.
- Maturação: formação de uma complexa arquitetura, canais e poros para o transporte de nutrientes. É nessa etapa que ocorre a troca de material genético como plasmídeos e enzimas, além do biofilme se tornar mais resistente.
- Dispersão de células: as bactérias constituintes do biofilme apresentam um modo de comunicação intra e interespécie denominado *quorum sensing*; é através desse mecanismo que há a regulação de várias características fenotípicas, dentre elas a dispersão de parte das células contidas no biofilme. Desta maneira, os microrganismos aderidos passam para sua forma planctônica, tornando-se células livres para encontrar uma nova superfície de aderência e formar um novo biofilme.

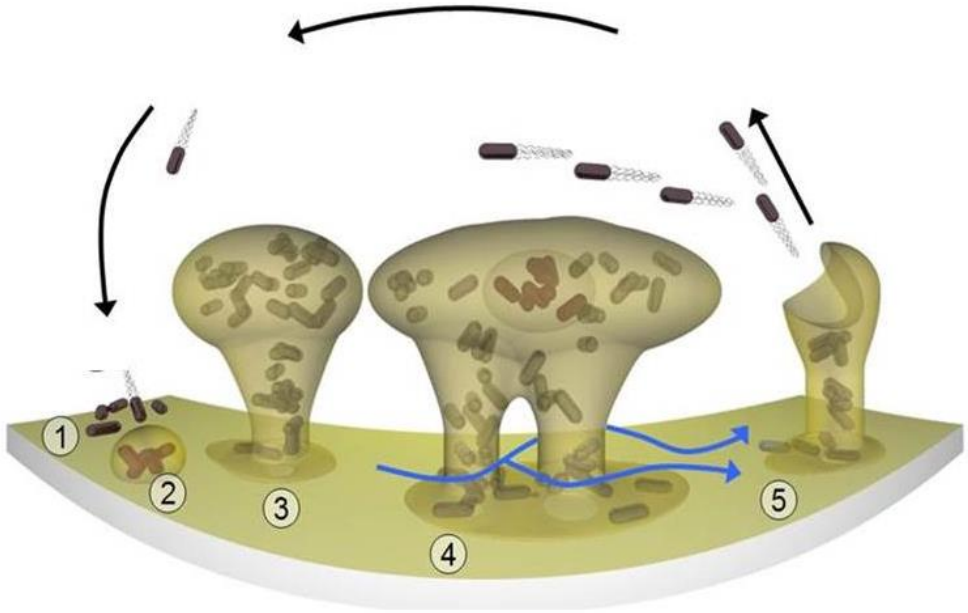

Figura 2: Ilustração esquemática do desenvolvimento de um biofilme bacteriano: 1 – adesão reversível; 2 – adesão irreversível; 3 – crescimento do biofilme; 4 – maturação do biofilme; 5 – dispersão. (Fonte: http://cronodon.com/BioTech/Bacterial_Society.html)

Por muito tempo acreditou-se que a formação de biofilme em úlceras dérmicas não era possível, e os microrganismos ali encontrados permaneceriam em sua forma planctônica. Entretanto, trabalhos como o de Zanin *et al*. (2006)[76] e Bjarnsholt *et al*. (2008)[77] mostraram que úlceras tornam-se crônicas e não cicatrizam facilmente devido a presença de bactérias em forma de biofilmes, o que impede a ação direta de fármacos sobre as mesmas, e lhes confere maior resistência tanto a medicamentos tópicos quanto sistêmicos. James *et al*. (2008)[78] observaram que em úlceras agudas as bactérias eram mais comumente encontradas como células individuais ou pequenas micro colônias, e não como agrupamentos em biofilmes, como visto apenas em úlceras crônicas.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Microrganismo em forma de bastonete (2 a 4 µm), Gram (-), flagelado e aeróbico, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta grande importância médica por colonizar facilmente superfícies sob diversas condições [79]. Sua virulência está associada a sua habilidade de aderir à superfície da célula hospedeira, formando biofilme e secretando toxinas e enzimas hidrolíticas [80].

Por formar biofilmes resistentes e ser altamente resistentes a antibióticos tanto tópicos quanto sistêmicos [81], essa espécie de bactéria é considerada o terceiro patógeno mais comum relacionado a infecções hospitalares. As *P. aeruginosas* são também amplamente encontradas em úlceras crônicas em sua forma de biofilme (52% dos casos), sendo, quando presentes, responsáveis por um aumento significativo no tamanho do leito dessas lesões [82].

- ***Staphylococcus aureus***

A *Staphyloccocus aureus*, bactéria Gram (+), apresenta forma de cocos (esférica), com tamanho aproximado de 1 µm, sendo um microrganismo aeróbico capaz de se agrupar e formar cachos semelhantes aos de uva, com colônias de cor amarelada. Essa espécie de bactéria é a mais comumente encontrada, sendo a mais virulenta de seu gênero [83].

Apresentando uma alta virulência, esse microrganismo é resistente a antibióticos e está relacionado a diversas doenças, incluindo enfermidades sistêmicas fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar [83]. Essa espécie é também comumente encontrada no leito de úlceras dérmicas crônicas, em uma porcentagem aproximada de 93 – 95% dos casos. Acredita-se que esse patógeno seja resistente aos peptídeos antimicrobianos (AMP's) por

apresentar proteinases degradantes da LL-37, o que reduz a sua capacidade bactericida, dificultando, ou até mesmo impossibilitando, a eliminação eficaz da *S. aureus* [84].

OBJETIVOS

Geral:

Testar a sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphyloccocus aureus à PACT* com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl), com irradiações laser de baixa intensidade (LLLT).

Específicos:

- Averiguar se a presença de Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC – AlAl) possibilita a eliminação eficaz tanto de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphyloccocus aureus.*

- Verificar se a dose energética eficaz para inativação de microrganismos, na presença de FC-ClAl, é a mesma recomendada para o estímulo fibroblástico, favorecendo o processo cicatricial da lesão.

- Analisar possíveis danos ao biofilme bacteriano após aplicação de PACT /FC-ClAl.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICRORGANISMOS

Cepas de campo de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies essas mais frequentemente encontradas em úlceras dérmicas contaminadas, foram selecionadas para os testes da metodologia da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl), associada à irradiação laser. As culturas foram obtidas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/AQA, em meio líquido BHI, previamente inoculadas e incubadas por 24 horas. A partir destas, foram feitos estoques em tubos ágar inclinado, inoculando-se uma alça de cada cultura em tubos contendo Muller Hinton ágar. Após um período de incubação de 24 horas a 37 ^{o}C, as culturas foram armazenadas em geladeira a 4 ^{o}C para utilização por um período de 1 mês, sendo substituídas por novos estoques a partir de culturas congeladas (-20 ^{o}C), também preparadas e estocadas a partir das culturas em meio líquido BHI previamente obtidas.

FOTOTERAPIA (LLLT)

As aplicações laser foram realizadas com comprimento de onda de 670 nm (vermelho), com doses de 35, Potência = 100 mW. O aparelho utilizado foi um protótipo da DMC – Equipamentos, chamado FisioLase.

FÁRMACOS

Foram utilizadas 4 formulações diferentes para inativação de microrganismos, todas elas adquiridas do Instituto de Química – FFCLRP/ USP- RP, com o Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco.

As misturas reacionais foram divididas da seguinte maneira:

1- formulação aniônica vazia (ausência de Ftalocianina): FV
2- formulação catiônica vazia: FCV
3- formulação aniônica Ftalocianina: FAPc
4- formulação catiônica Ftalocianina: FCPc

As alterações químicas das substâncias 2 e 4 foram realizadas com base no potencial zeta da superfície polimérica das formulações, as quais eram negativas e passaram a se comportar com potencial resultante positivo.

A diluição inicial das amostras [38 µmol/mL] foi realizada com água de Milli-Q estéril para uma concentração final desejada de 5µmol/mL. Tal concentração de 5 µmol/mL foi selecionada por ter demonstrado eficácia para a inativação microbiana em testes pilotos realizados antes do início dos experimentos, através da técnica de mínima concentração inibitória (MIC).

MÉTODOS DE ANÁLISES

Foi realizada, após as aplicações de LLLT - PACT, a inoculação de *P. aeruginos* e *S. aureus* em placas contendo Müller Hinton Agar através do método da gota [85], por 24h, para

posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para tanto, retirou-se amostras de 1 mL de cada poço da placa de 24 poços, as quais foram submetidas a diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-9}. Posteriormente a esse processo, foram retiradas gotas de 15µL referentes a cada diluição, depositando-as na placa e incubando-as a 37° C por 24h para contagem final das colônias nas gotas que apresentavam de 5 a 50 UFC. A determinação do número de células viáveis foi feita através da média do número de colônias multiplicada pela diluição, resultando desta forma, no número de unidades formadoras de colônia por mililitro de solução (Figura 3).

Para a padronização do número de células viáveis em suspensão utilizadas nos experimentos, determinou-se a densidade ótica da suspensão 10^{-1} a 610 nm, para posterior comparação com as demais, obtendo-se, desta forma, uma estimativa do número de células por meio de sua turbidez.

A quantificação dos microrganismos foi também determinada através de um ensaio colorimétrico sensível e reprodutível de viabilidade. Este ensaio consistiu no acréscimo ao meio de cultura (adaptado para microplaca de 96 poços) de uma solução contendo sal MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazólio. Ao ser veiculado em solução salina, o MTT é solúvel em água e apresenta uma coloração amarela. Essa substância, quando incorporada por células viáveis, tem a forma estrutural do anel de seu componente tetrazólio lisado pelas enzimas de-hidrogenases mitocondriais, dando origem a cristais insolúveis de formazina na coloração azul / roxo escuro.

O MTT foi diluído em água destilada estéril (pH 7.2) de maneira a se obter uma concentração final de 0,1%. Dez microlitros (10µL) dessa solução foram adicionados a cada poço da microplaca, após serem submetidos aos tratamentos anteriormente descritos. Seguindo-se o

período de incubação a 37°C, a absorbância foi medida em espectrofotômetro da marca Thermoplate com comprimento de onda de 560nm, onde considerou-se os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular [86; 87].

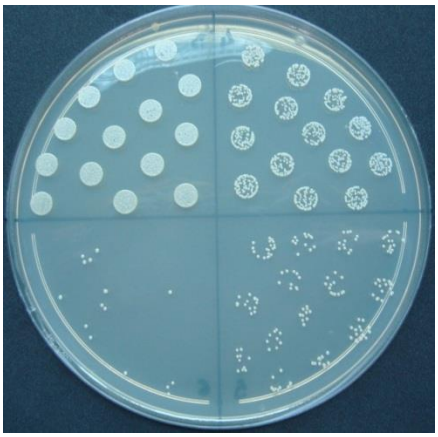

Figura 3: Exemplo da contagem em placa pelo método da gota.

CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas foram obtidas em meio líquido BHI previamente inoculadas e incubadas por 24 horas. A partir destas, foram feitos estoques em ágar inclinado, inoculando-se uma alça de cada cultura em tubos contendo Muller Hinton ágar. Depois de um período de incubação de 24h a 37 ^{o}C, as culturas foram armazenadas em geladeira a 4 ^{o}C para utilização por um período de 1 mês, sendo substituídas por novos estoques a partir de culturas congeladas (-20°C), também preparadas e estocadas a partir das culturas em meio líquido BHI previamente obtidas.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Duzentos microlitros de uma solução com dispersão óptica inicial (DO) de 0.190 (*P. aeruginosa*) e 1,150 (*S. aureus*) foi semeado em microplacas de 24 poços contendo cada um 1,0 mL de caldo Müller Hinton. Para análises de absorbância com MTT, foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo 180 µL do mesmo meio de cultura e 20 µL de microrganismos com mesma turbidez inicial tanto para *P. aeruginosa* quanto *S. aureus*. Ambos os cultivos foram realizados 24 horas antes do início dos tratamentos para assegurar a formação de biofilme maduro nas amostras.

- Grupos submetidos à PACT – Ftalocianina cloro-Alumínio:

Antes da aplicação dos fármacos, retirou-se 75 % do meio de cultivo, seguindo-se a aplicação ao restante nos poços das 2 formulações, as quais tiveram um tempo de 45 minutos de ação em contato com as amostras, em meio escuro. Seguiu-se com acréscimo de 10 µL de MTT aos grupos experimentais das microplacas de 96 poços para posterior análise da absorbância das amostras pré-lavagem. Para a análise dos grupos pós-lavagem seguiu-se os mesmos procedimentos anteriormente descritos, procedendo-se, após o tempo de contato dos fármacos com as amostras, a lavagem dos poços com tampão salino PBS, para posterior fotoativação laser. Após 30 minutos de descanso das amostras, acrescentou-se o MTT para análise de absorbância. As microplacas de 24 poços, após os 30 minutos de descanso da amostra, foram submetidas a banho de ultrassom (US) por 10 minutos, visando soltar os microrganismos aderidos, seguindo-se da inoculação dos “pellets” bacterianos em placa de Petri contendo Müeller Hinton Agar (método da gota), com posterior contagem das UFC.

- Grupos submetidos à terapia laser de baixa intensidade (LLLT):

A aplicação da LLLT foi realizada nas amostras de biofilme maduro de ambos os microrganismos após a lavagem dos poços com tampão – PBS, seguida da aplicação de 1 mL (microplaca de 24 poços) e 180 µL (microplaca de 96 poços) de PBS para as irradiações laser – 670 nm, 35 J/cm^2, 100 mW. Um intervalo de 30 minutos de repouso pós-irradiação foi observado antes da submissão das placas a banho de ultrassom (US) por 10 minutos, para soltura dos microrganismos aderidos nas microplacas de 24 poços, seguido da inoculação dos resíduos ("pellets" bacterianos) em placa de Petri contendo Müeller Hinton Agar (método da gota), com posterior contagem das UFC. Houve acréscimo de 10 µL de MTT nos grupos experimentais das microplacas de 96 poços após os 30 minutos de repouso das amostras, visando posterior análise da absorbância das amostras.

Nessas etapas houve também um grupo controle o qual recebia apenas o fármaco e não as irradiações de laser, objetivando averiguar se este apresenta alguma ação sobre o biofilme formado nos poços.

Para a realização da leitura de absorbância com MTT associado, adaptou-se a metodologia para utilização de microplacas de 96 poços. Desta forma, a quantidade de nutriente e de microrganismos utilizados passou para 180µL e 20µL, respectivamente. Os procedimentos de lavagem e tempos de espera foram mantidos, alterando-se apenas a quantidade de fármaco acrescentada, que passou a ser de 20µL. Para assegurar que a dose de laser recebida em cada poço era exatamente a que estava sendo aplicada, intercalou-se os poços preenchendo-se com papel alumínio aqueles que permaneceram "vazios", de forma a isolar os que continham as amostras de biofilme bacteriano. (Figura 4).

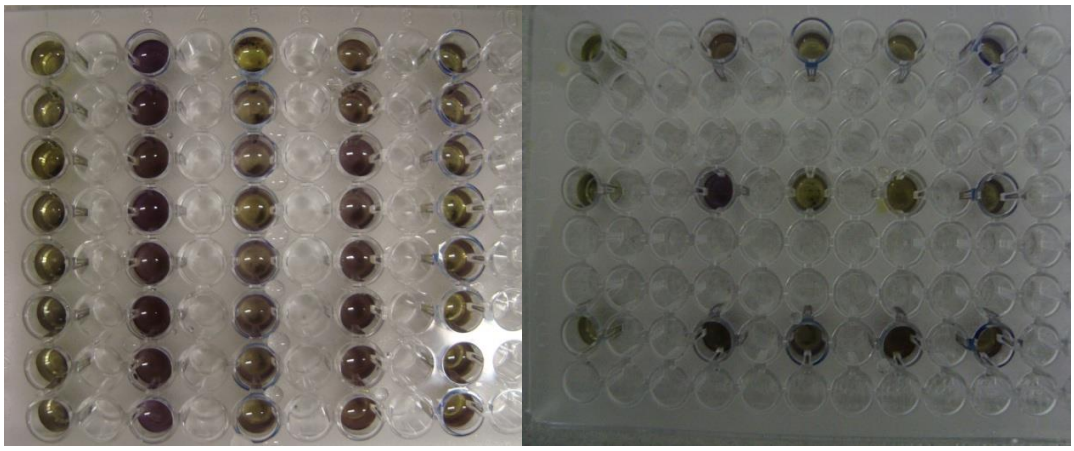

Figura 4: Aspecto geral das microplacas de 96 poços após acréscimo de MTT para posterior leitura da absorbância dos grupos experimentais em leitora de microplaca. As porções mais escuras (azul/roxo) representam os microrganismos viáveis, com atividade mitocondrial, e as mais claras (amarelas) os microrganismos inviáveis.

DESCARTE DO MATERIAL

Todo o material descartável utilizado nos procedimentos experimentais foi esterilizado em autoclave a 121 ^{o}C por 20 minutos, e posteriormente descartado em lixo comum. O material não descartável foi colocado de molho em solução de hipoclorito de sódio ou formaldeído (Lysoform), por 24h, antes de ser lavado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%, utilizando o software Origin v.8 (Origin Lab Corporation).

A análise de significância estatística foi realizada entre os grupos experimentais aplicando-se o teste de Fisher que averigua diferenças entre grupos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

ETAPA 1

Em geral, a metodologia da PACT envolve um tempo de incubação entre a célula/tecido e o fotossensibilizador por um período de tempo que pode variar de 30 – 60 minutos, seguindo-se de uma lavagem das amostras para uma posterior ativação pelo laser. Desta forma, uma análise da condição dos microrganismos na pré e na pós-lavagem seria de grande utilidade para constatarmos que o processo de lavagem das amostras não alteraria a integridade dos biofilmes formados, e compararmos a viabilidade das células antes e após a lavagem.

Sendo assim, essa primeira etapa visou analisar se a possível ação satisfatória da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) com a Ftalocianina Cloro-Alumínio está relacionada apenas à ação do fármaco utilizado ou se há interferência da lavagem pré-irradiação das amostras, utilizada nessa metodologia.

Para tanto, o experimento consistiu dos seguintes grupos:

- Controle (C): grupos que não foram submetidos a nenhum tratamento.
- Formulação aniônica fármaco fotossensível (FAPc): grupos tratados com a Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl) aniônica, associada à irradiação laser.
- Formulação catiônica fármaco fotossensível (FCPc): grupos tratados com a Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl) com carga positiva, associada à irradiação laser.
- Controle laser (CL): grupos tratados apenas com a irradiação laser 35J/cm^2.

- Aspectos Macroscópicos

- Formulação fármaco fotossensível: FAPc

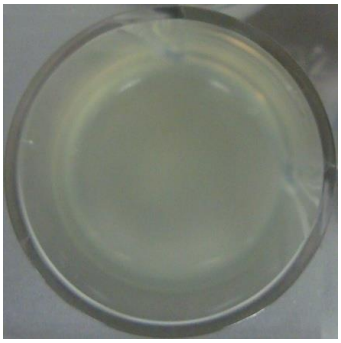

Figura 5: Nota-se uma ausência de alteração no biofilme microbiano, tanto de *P. aeruginosa* quanto de *S. aureus*, após os 45 minutos de contato com a FAPc.

- Formulação catiônica fármaco fotossensível: FCPc

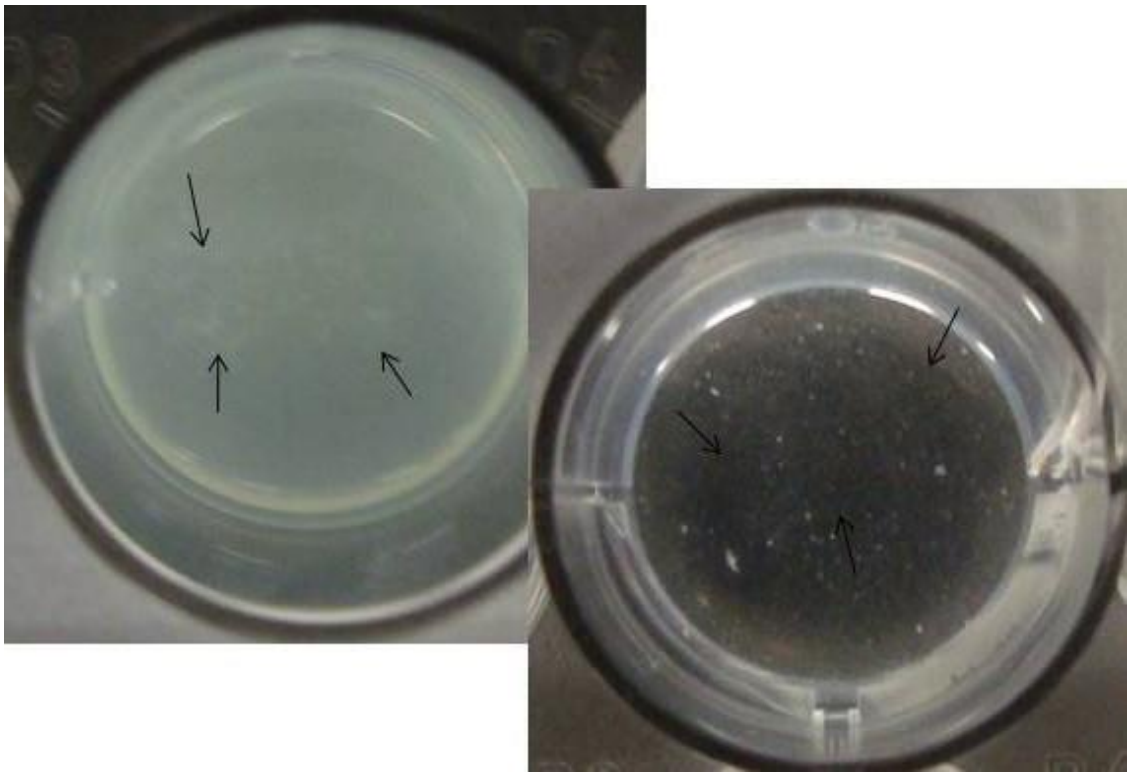

Figura 6: Na foto da esquerda, as setas apontam para uma granulação/aglutinação um pouco mais intensa do biofilme de *P. aeruginosa* após 45 minutos de contato com o fármaco. As setas na figura da direita apontam para locais de descontinuidade do biofilme microbiano.

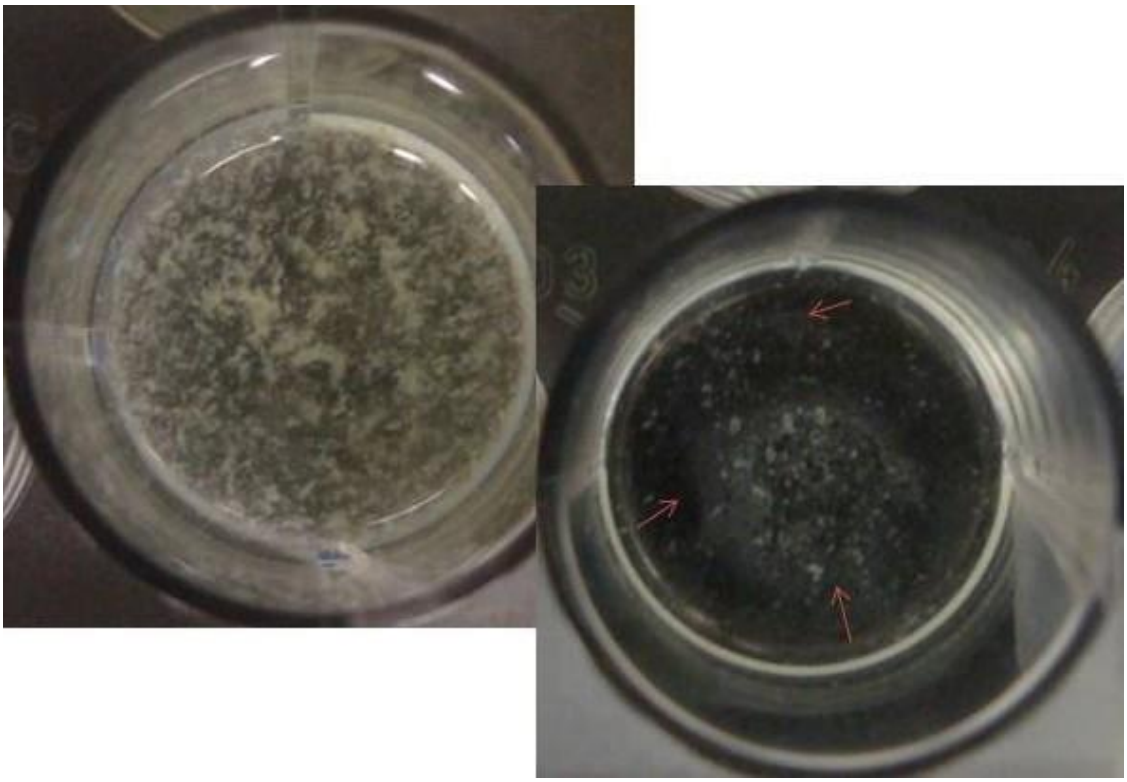

Figura 7: A foto da esquerda mostra no grupo de *S. aureus* uma intensa aglutinação/granulação do biofilme após 45 minutos de contato com FCPc. À direita, as setas apontam para um biofilme intensamente danificado, com pontos de descontinuidade e de considerável fixação do fármaco em questão.

Durante os procedimentos experimentais em placas de 24 poços observou-se, macroscopicamente, algumas alterações nos biofilmes bacterianos formados no fundo de cada poço, as quais foram amplamente visualizadas na formulação catiônica.

Nas figuras 6 e 7 pode-se facilmente visualizar pontos de descontinuidade nos biofilmes microbianos, observados antes mesmo de se ter a fotoativação dos fármacos em questão. Essas alterações podem ter sido determinadas por danos à sua estrutura, resultando em uma soltura com posterior aspiração do mesmo durante o processo de lavagem que antecede a aplicação do laser. Vale ressaltar que essas alterações macroscópicas foram visualizadas apenas após o tempo de aplicação de 45 minutos do fotossensibilizador catiônico. A formulação com apenas o fotossensibilizador aniônico (FAPc) não provocou alterações significativas a olho nu.

Após a realização das medidas de absorbância dos grupos experimentais, calculou-se as médias e desvios padrão de cada grupo, comparando-as para a verificação de eventuais diferenças de redução microbiana de cada fármaco utilizado. Os valores obtidos seguem nas tabelas abaixo:

Tabela 1: Média e desvio padrão dos grupos experimentais irradiados com laser 35J/cm^2. **CL**: grupo controle; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

Grupos *P. aeruginosa*

	Grupos	Abs média 670 nm	Desvio Padrão	Log UFC/mL (média)	Desvio Padrão
	CL	0,71	0,07	7,71	0,16
LASER 35	**FAPc**	0,62	0,08	7,32	0,07
	FCPc	0,23	0,07	6,05	0,07

Tabela 2: Média e desvio padrão dos grupos experimentais irradiados com laser 35J/cm^2. **CL**: grupo controle; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

Grupos *S. aureus*

	Grupos	Abs média 670 nm	Desvio Padrão	Log UFC/mL (média)	Desvio Padrão
	CL	2,71	0,04	8,32	0,04
LASER 35	**FAPc**	2,58	0,24	7,81	0,11
	FCPc	1,59	0,27	7,13	0,12

Nas tabelas 1 e 2 temos os valores médios de absorbância e número de UFC dos grupos experimentais tanto de *P. aeruginosa* quanto *S. aureus*. Na tabela 1 pode-se observar uma redução na densidade de células viáveis principalmente quando se compara o grupo controle laser (CL) ao grupo que foi fotoativado após receber a formulação catiônica (FCPc); já a redução observada em relação apenas ao uso da Ftalocianina irradiada com laser (FAPc) não foi

significativa, apontando para uma eficácia reduzida dessa substância para a inativação da *P. aeruginosa*. Ainda na tabela 1, em relação à contagem de UFC, que mostra o número de células não apenas viáveis, mas também cultiváveis, a redução observada segue os padrões obtidos na medida de absorbância, onde a substância mais eficaz, em relação ao grupo controle laser, foi a associada a uma carga catiônica, apontando mais uma vez para uma real vantagem de se utilizar a Ftalocianina cloro-alumínio com polaridade invertida quando se deseja uma inativação de microrganismos como a *Pseudomonas aeruginosa*.

A tabela 2 mostra os valores obtidos de absorbância e contagem do número de colônias após aplicação dos tratamentos em biofilmes de *S. aureus*, tanto com apenas irradiação laser quanto com a Ftalocianina fotoativada. Os resultados apontam para um comportamento semelhante desse microrganismo ao obtido com a *P. aeruginosa*, onde a substância mais eficaz para uma ação antimicrobiana foi a formulação com caráter catiônico (FCPc), mesmo a redução tendo sido menor, menos significativa.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos grupos experimentais pré e pós-lavagem dos poços da microplaca de 96 poços. **C**: grupo controle; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

	Grupos *P. aeruginosa*		
	C	**FAPc**	**FCPc**
Abs média à 630 nm (pré-lavagem)	1,34	1,10	1,02
Desvio Padrão	0,22	0,14	0,23
Abs média à 630 nm (pós – lavagem)	1,25	0,65	0,42
Desvio Padrão	0,10	0,08	0,06

Tabela 4: Média e desvio padrão dos grupos experimentais pré e pós-lavagem dos poços da microplaca de 96 poços. **C**: grupo controle; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

	Grupos *S. aureus*		
	C	**FAPc**	**FCPc**
Abs média à 630 nm (pré-lavagem)	2,553	2,574	1,571
Desvio Padrão	0,25	0,24	0,64
Abs média à 630 nm (pós – lavagem)	2,579	2,584	1,550
Desvio Padrão	0,11	0,28	0,12

Entre os grupos pré e pós-lavagem (tabelas 3 e 4), as medidas de absorbância apontam para uma redução no número de microrganismos em alguns grupos experimentais, mostrando uma possível interferência da metodologia utilizada na PACT para determinar, mesmo antes da fotoativação laser, uma redução na quantidade de microrganismos nas amostras utilizadas. A tabela 3 traz os valores obtidos após aplicação dos fotossensibilizadores nos grupos com *P. aeruginosa*, e nela pode-se observar que a redução obtida na densidade de microrganismos após a aplicação do fármaco, por 45 minutos, seguida de lavagem dos poços na preparação das amostras para posterior ativação laser, foi bastante elevada, sendo essa redução considerada como estatisticamente significativa (tabela 5) para os grupos FAPc e FCPc. Esses dados, porém, não invalidam a técnica para a realização da PACT/FC-ClAl uma vez que, em relação ao grupo controle, não foi observada uma redução significativa (tabela 5) nos grupos pré e pós lavagem. A técnica que envolve a pré-lavagem das amostras antes da fotoativação do fármaco só seria considerada inadequada caso determinasse, já no grupo controle, uma redução significativa na densidade de microrganismos, uma vez que apontaria para uma ação mecânica de soltura do

biofilme. Esses dados podem indicar uma ação prévia dos fármacos utilizados na possível ocorrência de danos (poros) à estrutura dos biofilmes de *P. aeruginosa*, fato esse que estaria ocasionando um desprendimento de microrganismos, os quais foram aspirados durante o processo de lavagem pré fotoativação.

Em relação à *S. aureus* as diferenças estatísticas significativas não foram muito evidentes ao se comparar os grupos pré e pós-lavagem (tabela 4). A formulação que mais apresentou diferenças relevantes ao se comparar os subgrupos em questão foi, mais uma vez, a catiônica (tabela 7). Tais dados permitem observar que, nesse caso, a droga utilizada não foi capaz de determinar a morte das bactérias sem que houvesse a aplicação da luz. As diferenças entre os subgrupos visualizadas na solução catiônica apontam para uma possível ação da carga positiva para ocasionar uma ruptura do biofilme com consequente liberação dos microrganismos aderidos à superfície, os quais foram aspirados durante o processo de lavagem, levando a uma redução no número de bactérias.

Tabela 5: Comparação entre os grupos pré e pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *P. aeruginosa.*

PÓS-LAVAGEM

PRÉ-LAVAGEM	C	FAPc	FCPc
C	0	1	1
FAPc	1	1	1
FCPc	1	1	1

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa

Tabela 6: Comparação entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *P. aeruginosa*

	PÓS-LAVAGEM		
LASER 35	C	FAPc	FCPc
CL	0	0	⊘
FAPc	0	0	⊘
FCPc	1	1	1

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
⊘ - ausência de redução de microrganismos em relação ao grupo pós-lavagem

Tabela 7: Comparação entre os grupos controles pré e pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *S. aureus*

	PÓS-LAVAGEM		
PRÉ-LAVAGEM	C	FAPc	FCPc
C	0	0	1
FAPc	0	0	1
FCPc	1	1	0

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa

Tabela 8: Comparação entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle pós-lavagem através do teste de *Fisher* - *S. aureus*.

	PÓS-LAVAGEM		
LASER 35	C	FAPc	FCPc
CL	0	0	⊘
FAPc	0	0	⊘
FCPc	1	1	0

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
⊘ - ausência de redução de microrganismos em relação ao grupo pós lavagem

As tabelas 6 e 8 trazem uma comparação estatística entre os grupos tratados com PACT/FC-ClAl (FAPc e FCPc) e laser 35J/cm^2 (CL) e os pós-lavagem. Em relação à *P. aeruginosa* (tabela 6), apenas o subgrupo que recebeu a formulação catiônica apresentou uma diferença estatística significativa quando comparado aos subgrupos do grupo pós-lavagem. Quando se compara os 2 subgrupos que receberam a formulação catiônica (FCPc), nota-se que a

fotoativação determinou uma redução ainda maior no número de microrganismos, apontando para uma possível otimização do processo de eliminação bacteriana quando se tem a irradiação laser do fármaco em questão.

A tabela 8 apresenta os resultados da comparação estatística entre os grupos experimentais com a *S. aureus*. Nela, nota-se um comportamento semelhante ao observado entre os grupos experimentais com *P. aeruginosa*, onde se obteve uma redução estatisticamente significativa apenas nos subgrupos que receberam o fármaco com polaridade invertida (carga positiva) quando comparados ao grupo pós-lavagem. Porém, ao contrário do obtido com a *P. aeruginosa*, não se observa uma redução ainda maior na densidade de microrganismos ao se ter a fotoativação da formulação catiônica. Esse dado aponta para uma eficácia menor desse fármaco para a eliminação de *S. aureus*.

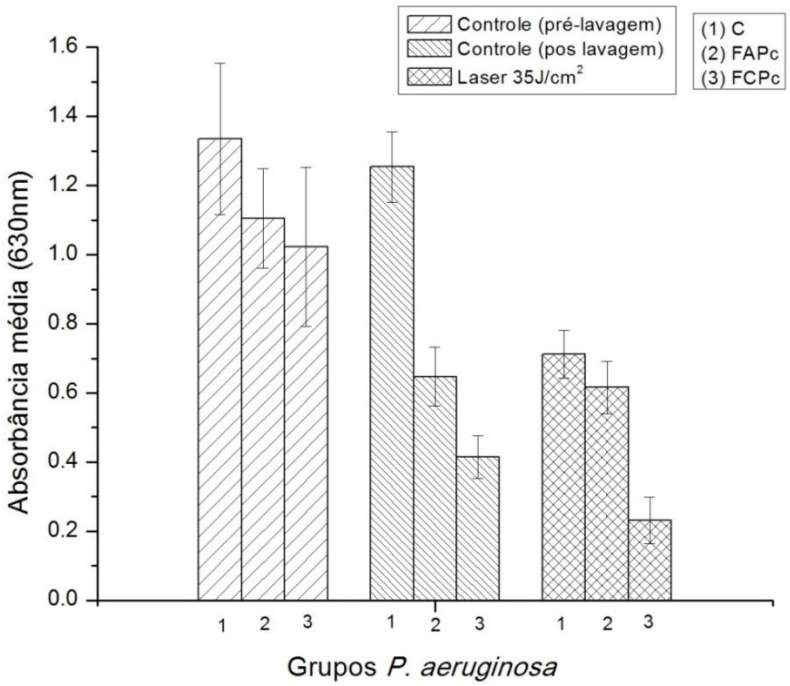

Figura 8: Gráfico com as médias e desvios padrão das medidas de absorbância referente aos grupos experimentais com *P. aeruginosa*.

Na figura 8 tem-se representado em forma de gráfico os valores de média e desvio padrão obtidos através da medida de absorbância após aplicação do MTT, no final de todo o procedimento experimental com a *P. aeruginosa*. Nele pode-se notar facilmente uma redução significativa no número de microrganismo nos subgrupos FAPc e FCPc dos grupos pós-lavagem e irradiados com laser 35J/cm^2, principalmente após a aplicação da PACT com a formulação catiônica, na qual se obteve também uma redução significativa em relação aos grupos controles pré e pós-lavagem. A redução visualizada para o grupo com apenas a Ftalocianina (FAPc) não foi tão significativa quanto à observada no grupo catiônico após a irradiação com laser vermelho, quando se compara ao subgrupo que recebeu apenas o laser 35J/cm^2 como tratamento (subgrupo CL do grupo laser 35J/cm^2).

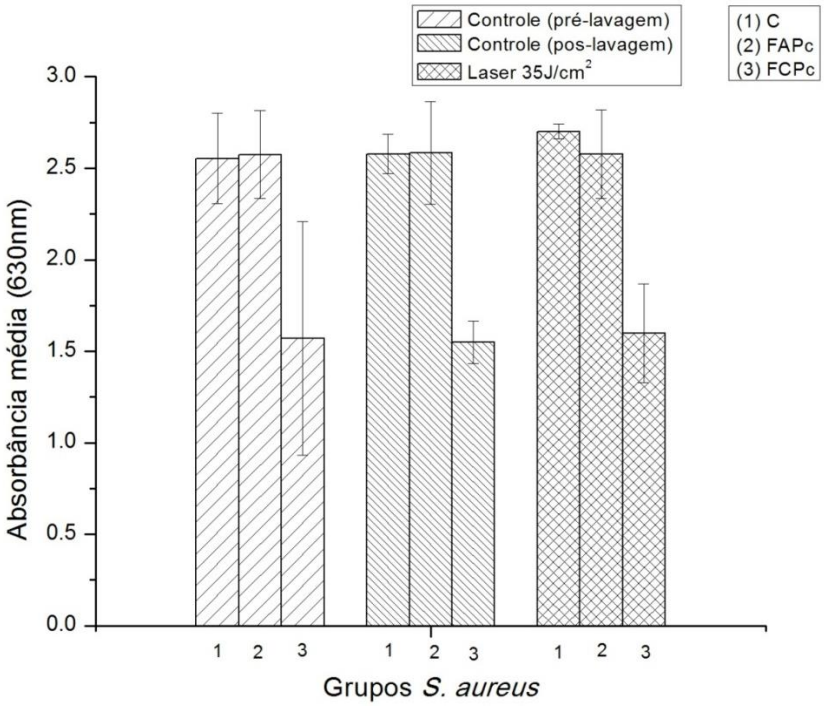

Figura 9: Gráfico com as médias e desvios padrão das medidas de absorbância referente aos grupos experimentais com *S. aureus*.

Nessa mesma figura 8, em relação ao grupo pré-lavagem, observa-se também uma leve redução no número de microrganismos nos subgrupos experimentais após exposição às drogas, sendo ela ainda maior no subgrupo que recebeu fármaco com polaridade invertida, indicando que há uma ação deste não apenas para determinar uma soltura do biofilme bacteriano, mas também para inativar os microrganismos envolvidos, mesmo antes de se realizar a lavagem e fotoativação das amostras. Pode-se observar também em relação a *P. aeruginosa* que, com exceção do grupo controle, a redução visualizada no grupo pós-lavagem é maior do que a do grupo pré-lavagem devido a uma possível associação entre uma morte prévia dos microrganismos com uma eventual soltura e posterior aspiração e eliminação daquelas bactérias que permaneceram vivas nos poços, mesmo após terem sido expostas aos fármacos por 45 minutos. Em relação aos grupos com laser, percebe-se mais uma vez uma maior redução ao se ter a associação da fotoativação com as formulações catiônicas. As reduções obtidas apenas com a utilização da Ftalocianina (FAPc) fotoativada apresentaram uma significância menor.

Em relação aos grupos com *S. aureus* observa-se, na figura 9, um comportamento que difere do obtido com a *P. aeruginosa*. Esse microrganismo mostrou uma sensibilidade menor tanto à PACT/FC-ClAl quanto ao laser vermelho somente. Nessa figura observa-se que a única substância capaz de determinar uma redução significativa no número de células bacterianas em todos os grupos foi a formulação catiônica (FCPc), a qual apresentou também grande eficácia nos grupos experimentais com *P. aeruginosa*. Nos subgrupos do grupo pré-lavagem, nota-se que essa substância de polaridade invertida teve um comportamento semelhante ao obtido com a *Pseudomonas aeruginosa*, onde uma redução no número de bactérias aponta para uma possível ação bactericida dessa formulação mesmo antes de ser lavada ou fotoativada, por possivelmente

ocasionar a ocorrência de poros no biofilme em questão, levando a uma morte prévia desses microrganismos.

Desta forma, conclui-se que o procedimento de pré-lavagem da metodologia utilizada na quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) não mostrou ter interferência nos resultados finais dos experimentos. A redução de microrganismos nos grupos pós-lavagem só foi observada nos grupos experimentais com a *Pseudomonas aeruginosa* que receberam os fármacos, apontando para uma ação da droga, e não da metodologia**.** Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais com *Staphylococcus aureus*, mesmo com a utilização das formulações com Ftalocianina Cloro-Alumínio. Foi possível também observar uma ação bactericida das substâncias testadas, encorajando a realização de análises mais detalhadas para averiguar se esse resultado se mantém com biofilmes mais maduros e se é mais eficaz com substâncias outras associadas à Ftalocianina Cloro-Alumínio.

ETAPA 2

Como já dito anteriormente, os tensoativos ou surfactantes apresentam atividade superficial e capacidade emulsificante, que atuam na interface entre duas fases de diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial. Desta forma, a associação de tensoativos com a FC-ClAl seria de grande importância já que suas propriedades detergentes atuariam como um coadjuvante para a eliminação eficaz de microrganismos, assim como impediriam a agregação entre suas moléculas, otimizando todo o processo de fotoativação.

As formulações utilizadas eram compostas de Ftalocianina e tensoativo Poloxamer (Pluronics), diluídos em óleo Miglyol 812, aumentando seu perfil de diluição. O Poloxamer é um copolímero de bloco de polioxietileno polioxipropileno com propriedades tensoativas que potencializam a solubilidade de diversos fármacos [88; 89]. É uma substância considerada um excelente carreador por apresentar baixo ponto de fusão (menos que 60ºC), baixa toxicidade, compatibilidade com outras substâncias e alta capacidade solubilizante [90].

Para avaliar se a possível ação positiva dos fármacos utilizados estaria relacionada só à interação entre a Ftalocianina e a luz laser, e não à ação do Poloxamer associado para aumentar a solubilidade da droga, optou-se por comparar grupos experimentais contendo só o tensoativo aniônico (FV) e o tensoativo com carga positiva (FCV) com as formulações apresentando Ftalocianina em sua composição.

Após a contagem das células viáveis e das medidas de absorbância dos grupos experimentais, calculou-se as médias e desvios padrão de cada grupo, comparando-as para a verificação de eventuais diferenças de redução microbiana de cada fármaco utilizado. Os valores obtidos seguem nas tabelas abaixo:

Tabela 9: Média e desvio padrão dos grupos experimentais. **C**: grupo controle; **FV**: formulação vazia; **FCV**: formulação catiônica vazia; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

Grupos *P. aeruginosa*

	Grupos	Log UFC/mL (média)	Desvio Padrão	Abs média à 630 nm	Desvio Padrão
CONTROLES	**C**	8,2	0,09	0,687	0,10
	FV	7,3	0,04	1,057	0,18
	FCV	5,75	0,09	0,591	0,06
	FAPc	7,4	0,05	0,647	0,08
	FCPc	5,9	0,11	0,415	0.06
LASER 35	**C**	7,7	0,16	0,712	0,07
	FV	7,1	0,04	1,012	0,06
	FCV	5,8	0,06	0,133	0,2
	FAPc	7,3	0,07	0,615	0,08
	FCPc	6,05	0,07	0,231	0,07

A tabela 9 apresenta os valores médios e os desvios padrão da contagem de UFC e das medidas de absorbância com MTT, obtidos nos grupos experimentais após serem submetidos à PACT com as drogas selecionadas e à LLLT com laser 35J/cm^2. Em relação ao numero de UFC, percebe-se uma redução numérica em todos os grupos ao serem comparados ao grupo controle negativo, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento. As reduções mais significativas foram visualizadas nas substâncias catiônicas tanto com quanto sem a fotoativação laser, levando ao questionamento se a eficácia observada está relacionada ao tensoativo, à carga catiônica, ou se a Ftalocianina apresenta realmente alguma ação bactericida uma vez que os valores finais alcançados foram muito similares. Para responder a essa questão, observa-se ainda na tabela 9, os

valores obtidos com a formulação vazia, a qual é composta apenas pelos tensoativo Poloxamer (FV), e a formulação com a Ftalocianina aniônica e o tensoativo (APc); houve também, em ambos os grupos, uma redução no número de microrganismos em relação ao controle negativo, mas esta não apresentou um valor estatisticamente significativo como os alcançados com as cargas catiônicas, mesmo com a fotoativação laser. Esses valores finais, por terem sido muito similares nesses 2 grupos (FV e APc) levam a crer que a maior eficácia das substâncias se deu não apenas devido à presença do tensoativo, mas também à associação da carga positiva, a qual possivelmente otimizou a fixação tanto do tensoativo quanto da Ftalocianina à membrana bacteriana. Nesses casos, em relação à *P. aeruginosa*, a fotoativação laser não apresentou resultados relevantes para determinar uma maior inativação microbiana.

Tabela 10: Média e desvio padrão dos grupos experimentais. **C**: grupo controle; **FV**: formulação vazia; **FCV**: formulação catiônica vazia; **FAPc**: formulação aniônica com fármaco fotossensível; **FCPc**: formulação catiônica com fármaco fotossensível.

Grupos *S. aureus*

	Grupos	Log UFC/mL (média)	Desvio Padrão	Abs média à 630 nm	Desvio Padrão
CONTROLES	**C**	8,3	0,04	2,579	0,11
	FV	7,4	0,045	2,132	0,53
	FCV	6,4	0,05	1,491	0,12
	FAPc	8,9	0,12	2,584	0,28
	FCPc	7,0	0,17	1,550	0,12
LASER 35	**C**	8,3	0,04	2,701	0,04
	FV	7,2	0,04	2,454	0,53
	FCV	6,3	0,05	1,205	0,18
	FAPc	7,8	0,11	2,576	0,24
	FCPc	7,1	0,12	1,598	0,27

Em relação aos grupos experimentais com *S. aureus* (Tabela 10), os valores de UFC foram similares aos obtidos com a *P. aeruginosa*, onde a maior eficácia observada para a inativação das bactérias foi nos grupos com formulações catiônicas. Entretanto, nesse caso, os valores obtidos levam a crer que a eficácia maior foi do Poloxamer e não da Ftalocianina uma vez que a formulação vazia (FV), com e sem a fotoativação laser, apresentou valores finais menores do que os obtidos com o tensoativo associado ao fármaco fotossensível. Tais resultados também apontam para uma possível ação estimulatória da Ftalocianina em relação à *S. aureus* já que sua presença levou a uma menor redução microbiana, quando comparada ao grupo controle negativo. Nesse caso, em relação ao número de células cultiváveis, observou-se também que o laser não interferiu no crescimento bacteriano, sendo que sua ação não foi nem estimulatória e nem inibitória.

As comparações estatísticas em relação aos valores de absorbância, que analisaram a densidade de células viáveis nas amostras, estão representadas nas tabelas 11 e 12 abaixo. Na tabela 7 observa-se, mais uma vez, em relação a *P. aeruginosa*, uma real eficácia das formulações catiônicas associadas à irradiação laser 35 J/cm^2, quando comparados ao grupo controle negativo. Nesse caso, observa-se que a eficácia para inativação bacteriana se deu devido a presença do tensoativo já que tanto a FV quanto a FVC foram mais eficazes do que ao serem associados à Ftalocianina. A presença da Ftalocianina só se fez relevante ao ser associada à carga positiva, a qual foi tão eficaz quanto as formulações vazia e catiônica vazia, após serem submetidas à fotoativação laser. Em relação apenas ao tratamento com laser (LILT), diferenças estatísticas não foram observadas apontando para uma irrelevância desse tipo de tratamento no número de microrganismos.

Tabela 11: Comparação estatística entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle negativo de *P. aeruginosa*, levando-se em consideração os valores obtidos após as medidas de absorbância, na presença de MTT.

	CONTROLE				
LASER 35	C	FV	FCV	FAPc	FCPc
C	0	1	0	0	1
FV	1	0	1	1	1
FCV	1	1	1	1	1
FAPc	0	1	0	0	1
FCPc	1	0	1	1	1

Tabela 12: Comparação estatística entre os grupos de laser 35 J/cm^2 e controle negativo de *S. aureus* levando-se em consideração os valores obtidos após as medidas de absorbância, na presença de MTT.

	CONTROLE				
LASER 35	C	FV	FCV	FAPc	FCPc
C	0	1	1	0	1
FV	0	0	1	0	1
FCV	1	1	0	1	0
FAPc	0	0	1	0	1
FCPc	1	0	0	1	0

A tabela 12 traz diferenças estatísticas relevantes entre os grupos com *S. aureus* ao ser aplicada a fototerapia associada às formulações catiônicas. A eficácia da simples aplicação de laser 35 J/cm^2 para a eliminação de microrganismos não foi também observada, havendo ausência de diferença estatisticamente significativa ao serem comparadas ao grupo controle, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento. Esse dado é muito importante por indicar uma ausência de efeito estimulatório a esse tipo de microrganismo, ou seja, a luz laser nessa dose energética nem estimula e nem inibe a *S. aureus*, não determinando nem uma piora e nem uma melhora da lesão a ser tratada com esse recurso. As formulações sem a Ftalocianina (FV e FCV) apresentaram valores estatisticamente significativos apenas com a presença da carga catiônica. Os resultados alcançados sem a carga positiva foram similares para os grupos com apenas o tensoativo e com o tensoativo associado à Ftalocianina aniônica, apontando para uma possível

interferência microbiana apenas por parte do Poloxamer.

De maneira geral os resultados obtidos nessa etapa mostram que a eficácia maior se deu com a presença do Poloxamer e a carga positiva, não sendo muito relevante a presença da Ftalocianina. Entretanto, como apenas a análise da Ftalocianina não é viável, por essa substância aglomerar com facilidade e impossibilitar a fotoativação laser, considera-se importante a continuidade dos procedimentos experimentais, desta vez com biofilmes mais maduros, avaliando melhor a sua real eficácia.

ETAPA 3

Essa etapa objetivou testar a sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphyloccocus aureus à PACT* com Ftalocianina Cloro-Alumínio (FC-ClAl), com irradiações laser (LILT), em biofilmes mais maduros (72 horas).

Foram utilizadas 3 formulações diferentes :

- formulação catiônica vazia: FCV

- formulação aniônica com fármaco fotossensível: FAPc

- formulação catiônica com fármaco fotossensível: FCPc

Os grupos controles referentes a essas etapas consistiram de: apenas o fármaco e não as irradiações de laser, objetivando averiguar se este apresenta alguma ação sobre o biofilme formado nos poços; grupos que não recebiam os fármacos, apenas a irradiação da luz laser (controle laser - CL); e grupos que não sofreram qualquer intervenção (controle – C).

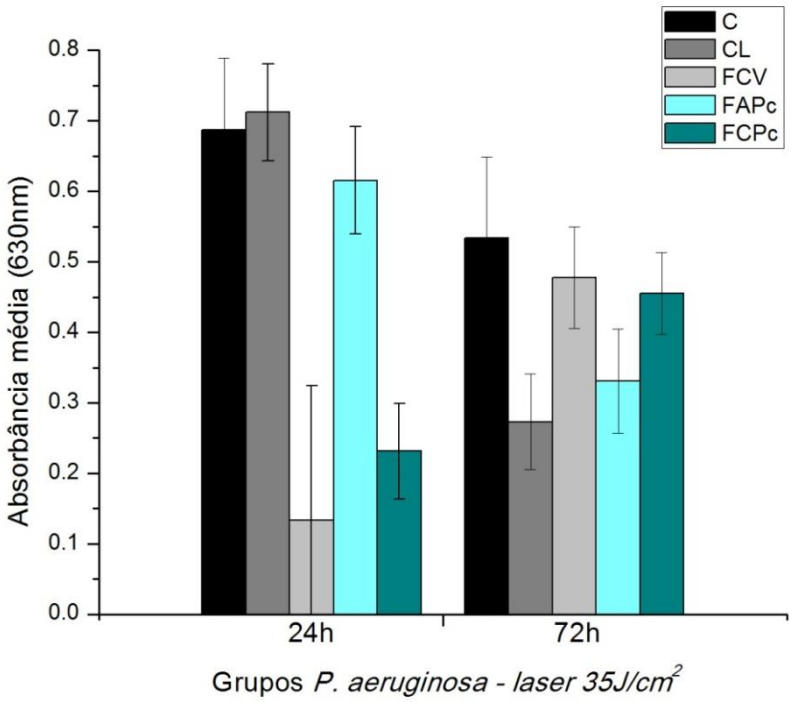

Figura 10: Gráfico de comparação das médias e desvios padrão entre os grupos experimentais com *P. aeruginosa* de 24h e 72h.

A figura 10 traz as médias e desvios padrão dos grupos experimentais onde se objetivou testar a eficácia dos fármacos em biofilmes mais maduros, comparando sua eficácia com a obtida com biofilmes de 24h. Em relação aos grupos com *P. aeruginosa*, observa-se que em relação aos respectivos grupos controle, a redução observada no numero de microrganismos com a utilização das drogas foi mais discreta em biofilmes de 72h do que em biofilmes de 24h, sendo a menor redução obtida apenas com a fotoativação laser, situação contrária à visualizada em biofilmes menos maduros, onde a luz laser determinou um considerável aumento no numero de bactérias. A maturidade e melhor constituição da estrutura dos biofilmes determinou uma resposta contrária à obtida nos experimentos anteriores, apresentando as substâncias com carga positiva uma eficácia reduzida para a inativação microbiana, e a substância aniônica, uma eficácia maior (tabelas 13 e 16). De maneira geral, em relação à *P. aeruginosa*, as reduções estatísticas significativas foram

alcançadas, em relação ao grupo controle 72h, através da simples irradiação laser (CL) e da PACT com Ftalocianina aniônica (FAPc). As reduções nos grupos experimentais com 24h de formação de biofilme já foi discutida anteriormente, sendo seus resultados expressos nas tabelas 13 e 15.

Tabela 13: Médias e desvios padrão das medidas de absorbância nos grupos experimentais com *P. aeruginosa* em biofilmes de 24h e 72h, após serem submetidos aos procedimentos experimentais.

***Pseudomonas aeruginosa* (Gram -)**

GRUPOS EXPERIMENTAIS	24 HORAS		72 HORAS	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
CONTROLE	0.7	0.10	0.54	0.11
CONTROLE LASER	0.7	0.07	0.30	0.07
FCV	0.13	0.2	0.5	0.07
FCPc	0.23	0.08	0.33	0.07
FAPc	0.62	0.07	0.45	0.06

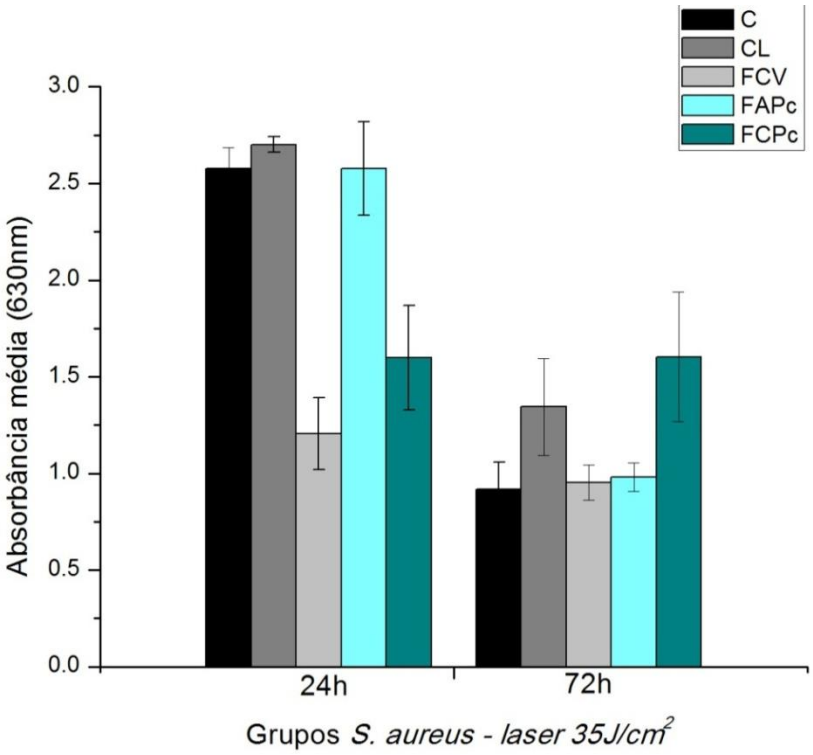

Figura 11: Gráfico de comparação das médias e desvios padrão entre os grupos experimentais com *S. aureus* de 24h e 72h.

Em relação ao comportamento do biofilme mais maduro da *S. aureus* à aplicação de PACT com Ftalocianina e seus derivados, a figura 11 mostra que em relação à simples aplicação de laser, houve também, assim como em biofilmes de 24h, um resultado estimulatório, tendo-se um aumento no numero de microrganismos, dessa vez numa proporção estatisticamente significativa (tabela 18). As formulações catiônicas nessas condições não apresentaram uma resultado satisfatório como o visto com 24h (Tabela 17), chegando até, no caso da FCPc, a haver um comportamento estimulatório da substância, levando à proliferação das bactérias. Em geral, os procedimentos tanto de LILT quanto de PACT / FC-ClAl não determinaram resultados satisfatórios para a inativação microbiana, apresentando a irradiação laser e a PACT - FCPc ação estimulatória em relação ao grupo controle 72h (tabela 14 e 18).

Tabela 14: Médias e desvios padrão das medidas de absorbância ns grupos experimentais com *S. aureus* em biofilmes de 24h e 72h, após serem submetidos aos procedimentos experimentais.

***Staphylococcus aureus* (Gram +)**

GRUPOS EXPERIMENTAIS	24 HORAS		72 HORAS	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
CONTROLE	2.57888	0.10656	0.91825	0.13978
CONTROLE LASER	2.701	0.04076	1.34433	0.24975
FCV	1.20533	0.18474	0.95233	0.09142
FCPc	1.59833	0.24342	0.98	0.07366
FAPc	2.57633	0.26968	1.6035	0.33523

Análise Estatística: teste de Fisher

Tabela 15: ***Pseudomonas aeruginosa*** (24h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2.

	24 HORAS				
GRUPOS	C	CL	FCV	FCPc	FAPc
C	-	0	1	1	0
CL	0	-	1	1	1

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
ø - ausência de redução / aumento de microrganismos em relação ao grupo controle laser

Tabela 16: ***Pseudomonas aeruginosa*** (72h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2.

	72 HORAS				
GRUPOS	C	CL	FCV	FCPc	FAPc
C	-	1	0	0	1
CL	∅	-	∅	∅	∅

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
∅ - ausência de redução / aumento de microrganismos em relação ao grupo controle laser

Tabela 17: ***Staphylococcus aureus*** (24h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2.

	24 HORAS				
GRUPOS	C	CL	FCV	FCPc	FAPc
C	-	0	1	1	0
CL	0	-	1	1	0

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
∅ - ausência de redução / maior numero de microrganismos no grupo controle laser

Tabela 18: ***Staphylococcus aureus*** (72h) – reduções significativas dos grupos experimentais em relação aos grupos controle e controle laser 35 J/cm^2.

	72 HORAS				
GRUPOS	C	CL	FCV	FCPc	FAPc
C	-	1	0	0	1
CL	∅	-	∅	∅	1

0 – diferença estatística não significativa
1 – diferença estatística significativa
∅ - ausência de redução / maior numero de microrganismos no grupo controle laser

Essa terceira etapa experimental mostrou que, em biofilmes mais maduros, observa-se uma ação positiva para a inativação bacteriana apenas quando se tem a presença da *P. aeruginosa*, através da PACT com a substância que associa o tensoativo Poloxamer com a Ftalocianina aniônica (PACT - FAPc). As outras formulações não apresentaram resultados satisfatórios para esse microrganismo, sendo mais vantajoso a simples aplicação da luz laser na dose de $35J/cm^2$.

Em relação à *S. aureus*, os procedimentos em questão mostraram que nenhum tratamento aplicado foi eficaz para determinar uma inativação microbiana quando se tem biofilmes mais maduros. Além de não ter inativado, a simples aplicação da luz e/ou a utilização da PACT com a substância que associa o Poloxamer à Ftalocianina positivamente carregada (PACT – FCPc) levaram a um aumento significativo no numero de microrganismos ao se comparar com o grupo controle 72h.

De maneira geral, essa etapa nos mostrou que não é vantajosa a aplicação dos tratamentos propostos em casos de biofilmes mais maduros e bem estruturados, havendo a necessidade de se adequar as substâncias para uma maior eficácia dos fármacos utilizados.

ETAPA 4

Durante os procedimentos experimentais em placas de 24 poços observou-se, macroscopicamente, algumas alterações nos biofilmes bacterianos formados no fundo de cada poço, constituidas de pontos de descontinuidade, mesmo antes de se ter a fotoativação do fármaco em questão. Tais alterações foram amplamente visualizadas nas formulações catiônicas.

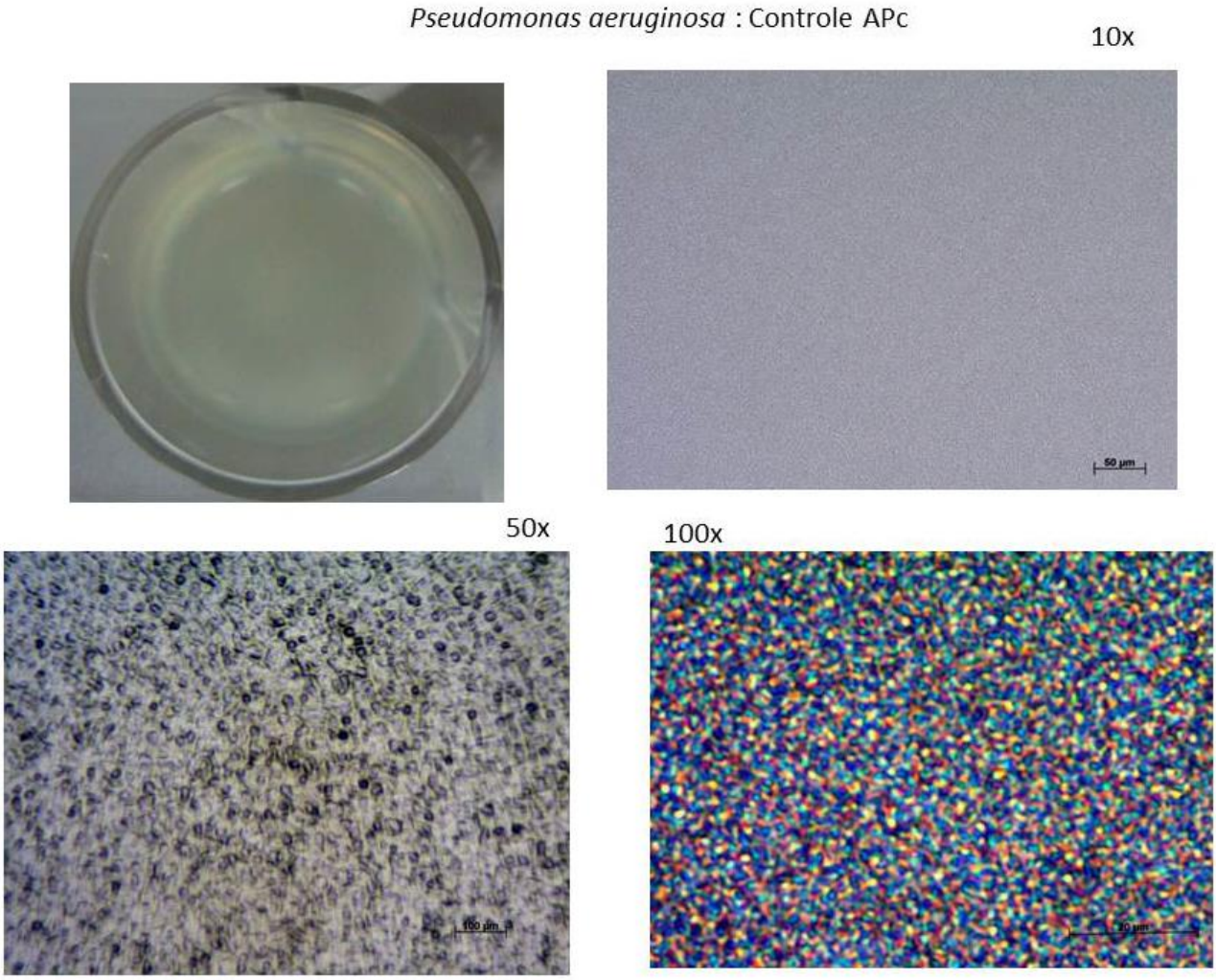

Figura 13: Aspecto microscópico das amostras do grupo controle com biofilme microbiano de *P. aeruginosa* após 45 minutos de contato com a FAPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

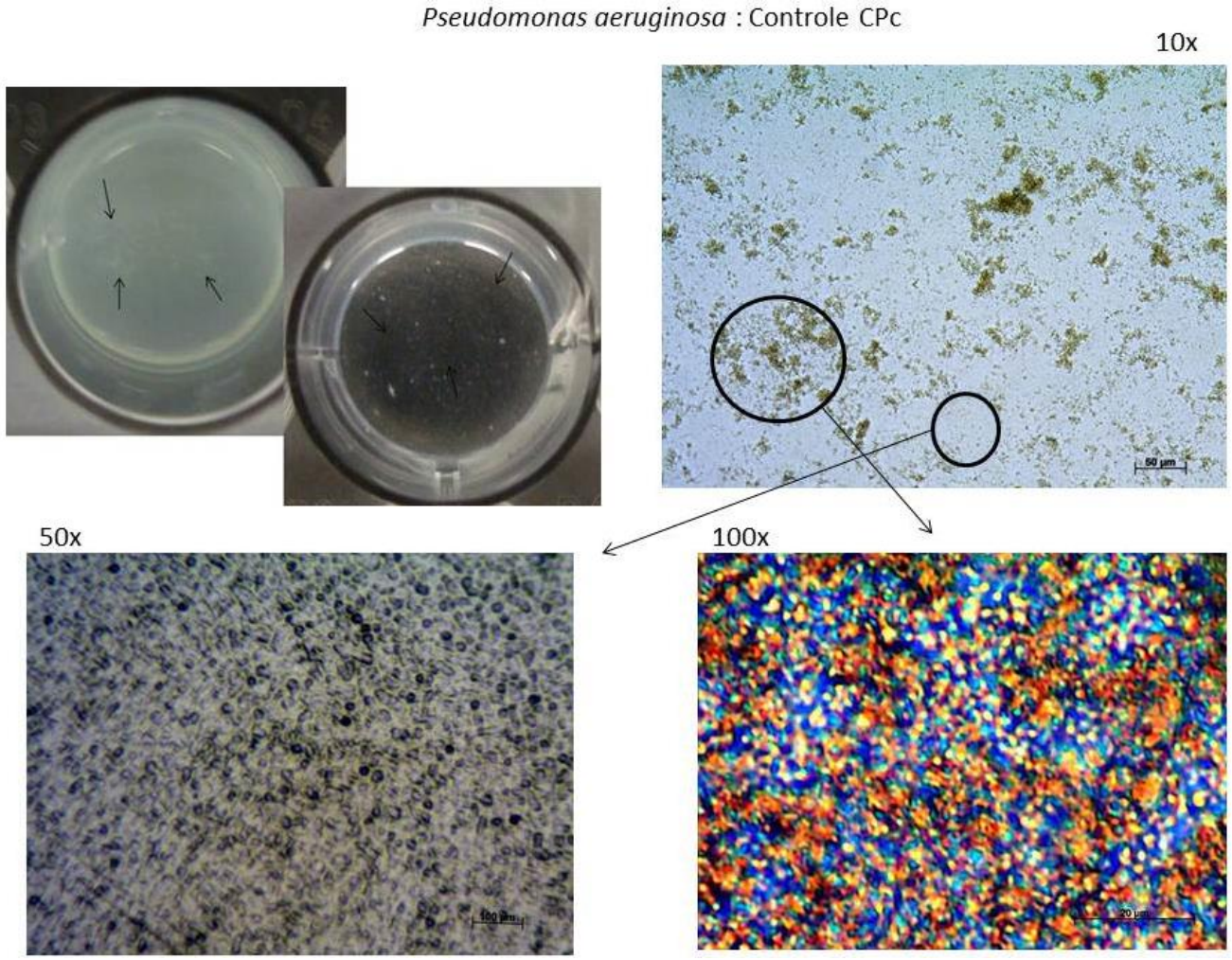

Figura 14: Aspecto microscópico das amostras do grupo controle com biofilme microbiano de *P. aeruginosa* após 45 minutos de contato com a FCPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

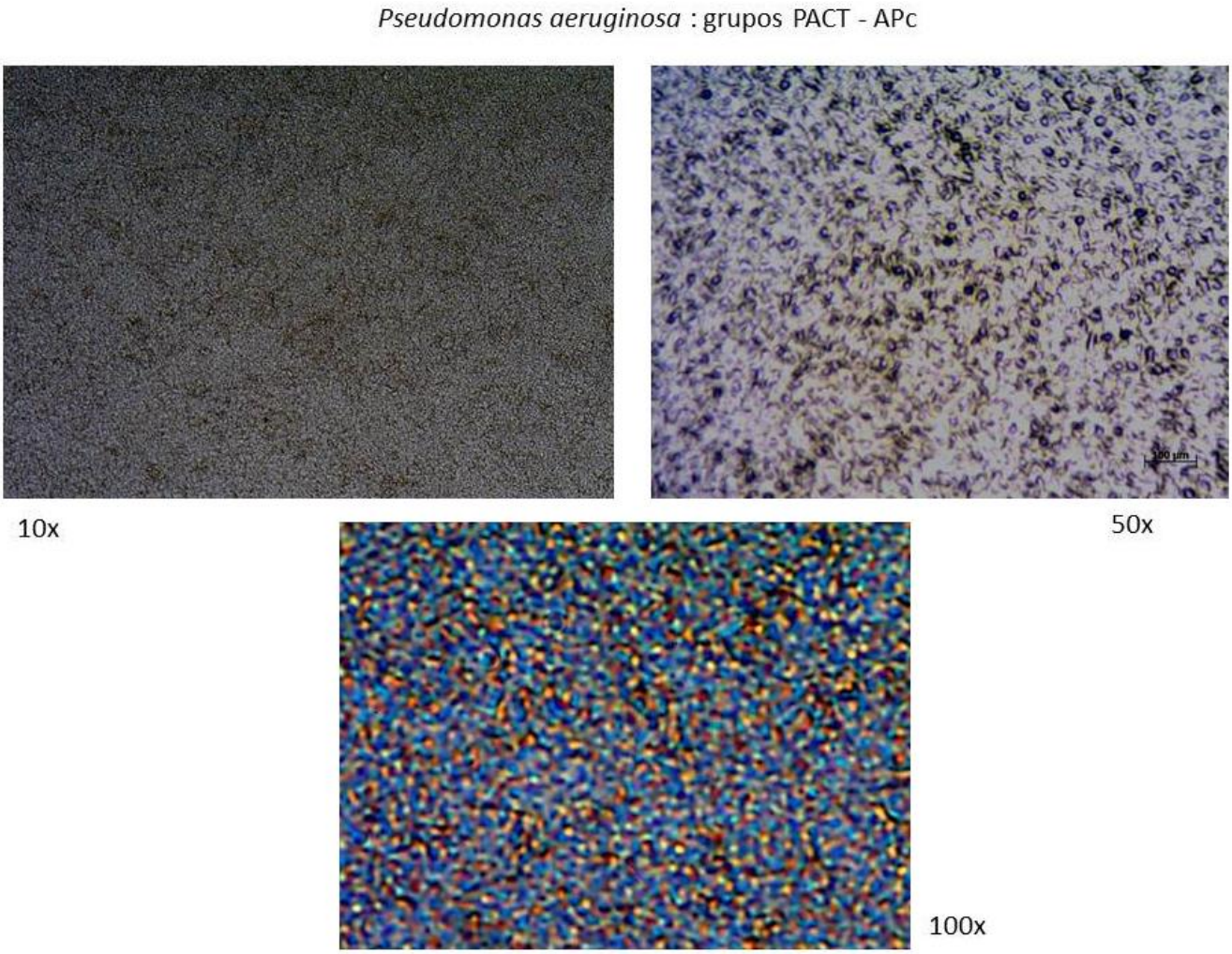

Figura 15: Aspecto microscópico das amostras do grupo PACT com biofilme microbiano de *P. aeruginosa* após 45 minutos de contato com a FAPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

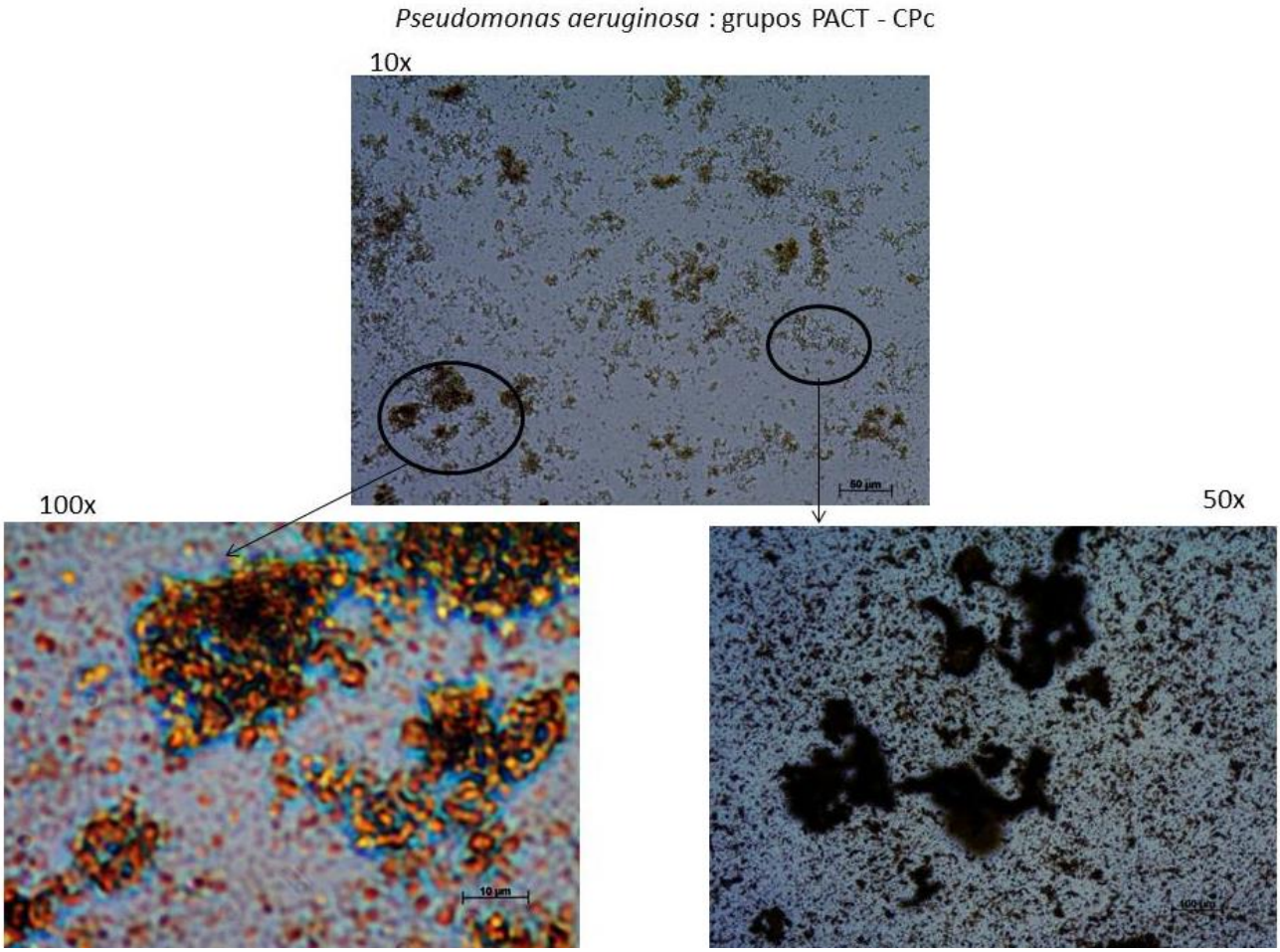

Figura 16: Aspecto microscópico das amostras do grupo PACT com biofilme microbiano de *P. aeruginosa* após 45 minutos de contato com a FCPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

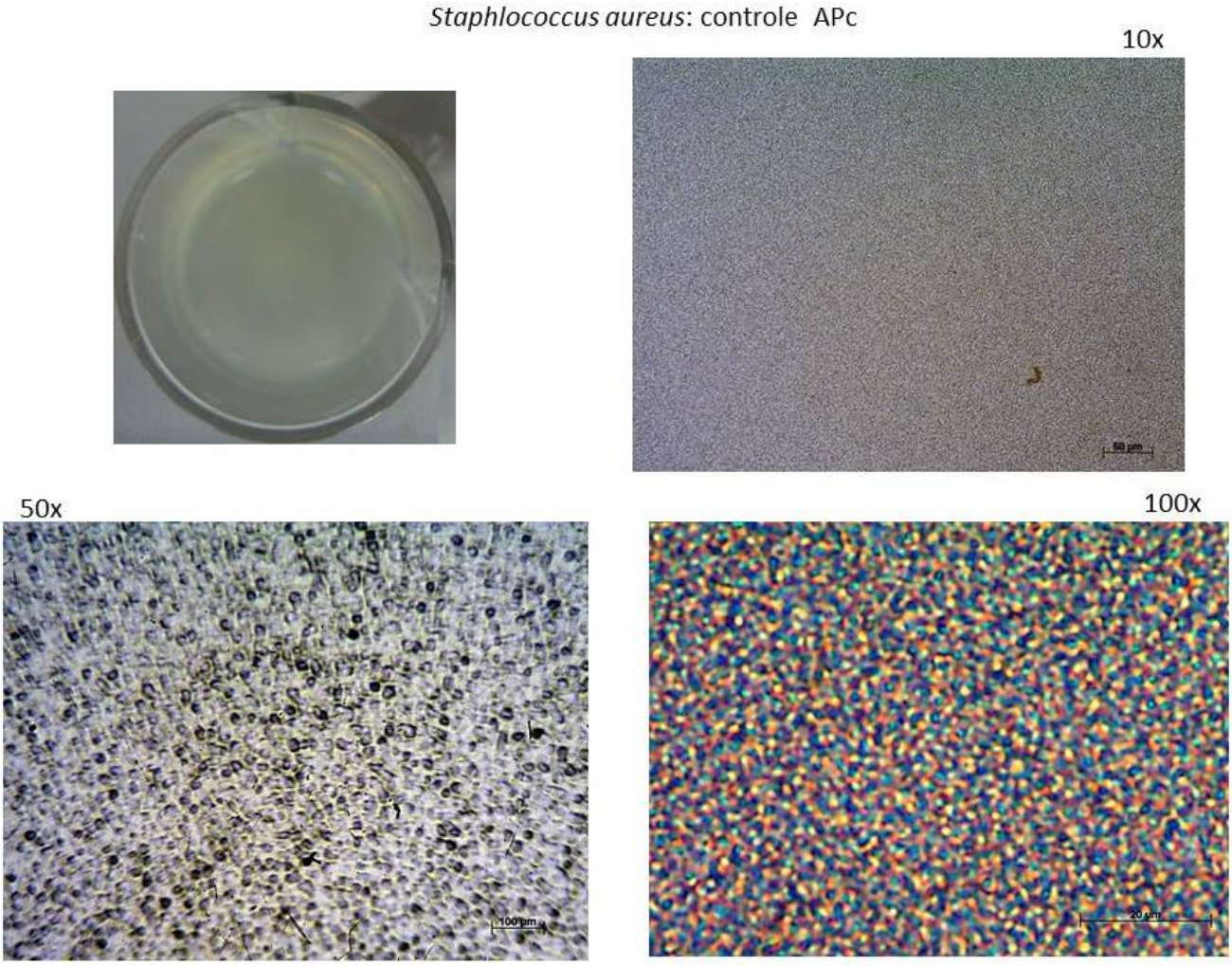

Figura 17: Aspecto microscópico das amostras do grupo controle com biofilme microbiano de *S. aureus* após 45 minutos de contato com a FAPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

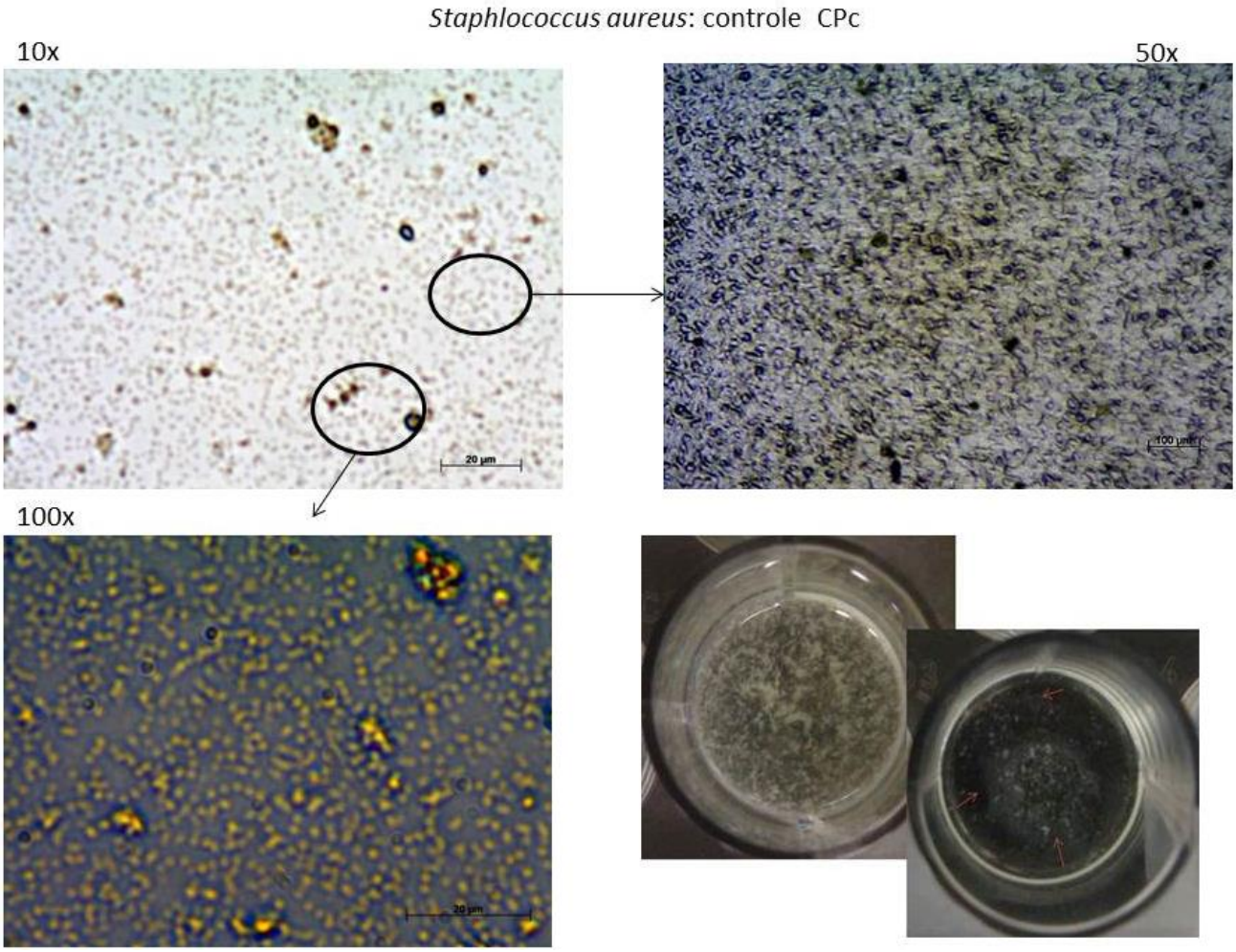

Figura 18: Aspecto microscópico das amostras do grupo controle com biofilme microbiano de *S. aureus* após 45 minutos de contato com a FCPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

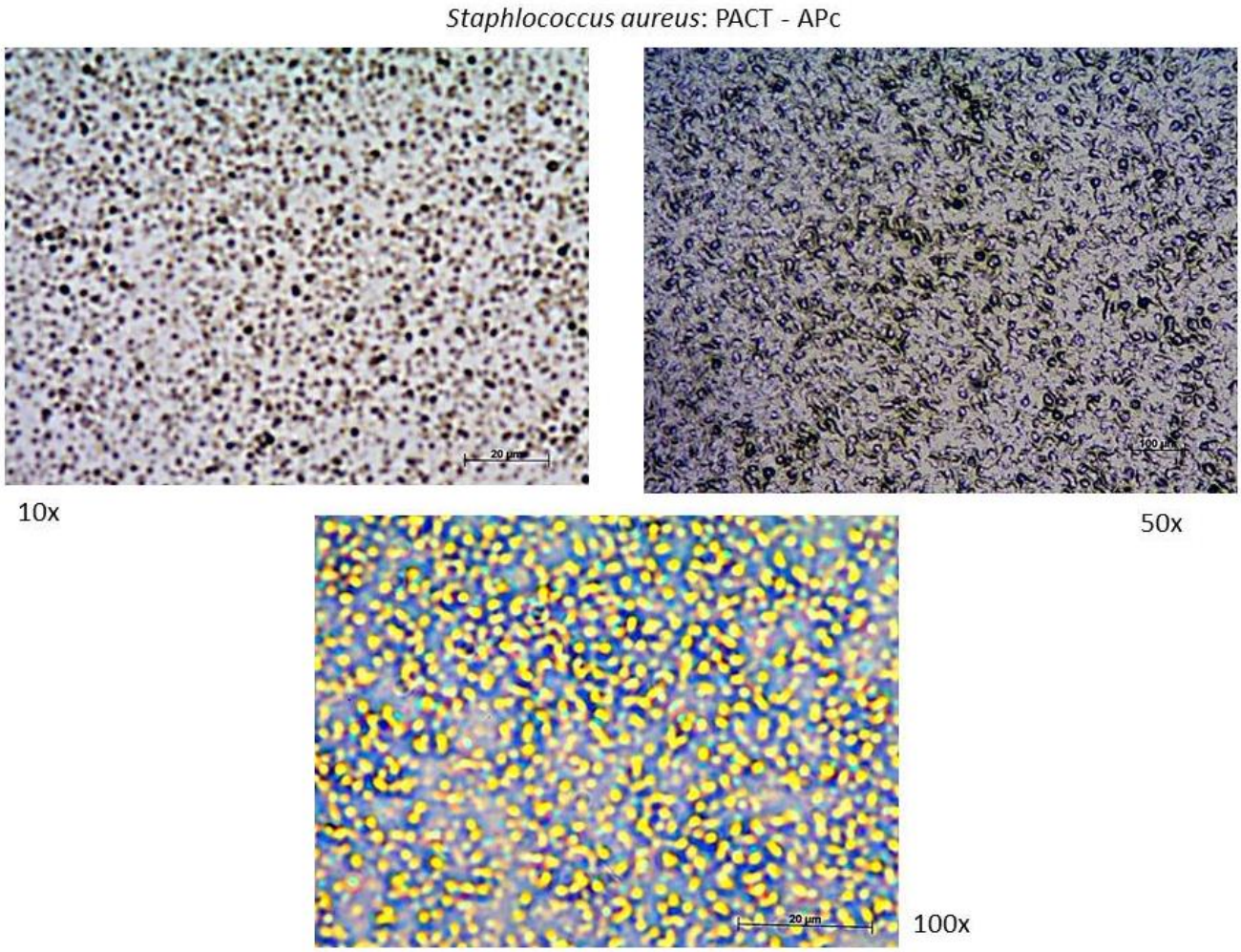

Figura 19: Aspecto microscópico das amostras do grupo PACT com biofilme microbiano de *S. aureus* após 45 minutos de contato com a FAPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

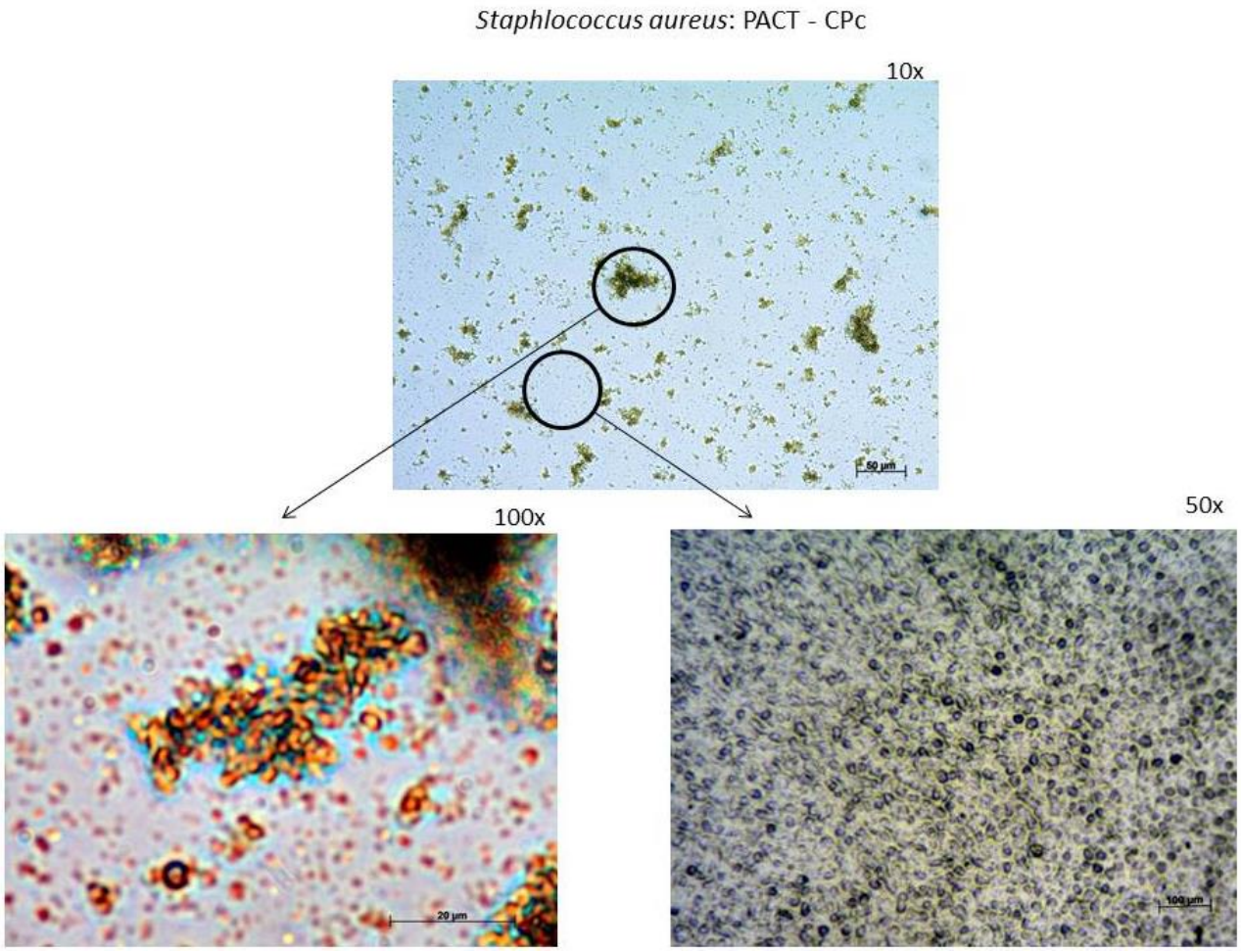

Figura 20: Aspecto microscópico das amostras do grupo PACT com biofilme microbiano de *S. aureus* após 45 minutos de contato com a FCPc, com aumentos de 10x, 50x e 100x, observadas através da microscopia óptica comum.

As análises realizadas em microscópio óptico comum confirmam os padrões observados macroscopicamente nas placas de 24 poços, onde as substâncias catiônicas, mesmo sem a fotoativação laser, foram capazes de desestruturar (fragmentar) o biofilme bacteriano formado após 24h de incubação (Figuras 14, 16, 18 e 20). Em relação à formulação aniônica e à simples aplicação da luz laser, não se observou alterações tão significativas, apesar de ter sido possível visualizar uma estrutura mais "espaçada", levemente descontínua, quando comparada ao grupo controle negativo (Figuras 19, 13, 15 e 17).

As figuras 19 e 8 trazem as imagens da *S. aureus* e da *P. aeruginosa* após PACT – FCPc. Durante o processo de obtenção de imagens, ficou evidente que a desestruturação do biofilme bacteriano se dava apenas em camadas mais superiores; em camadas mais profundas as células bacterianas ainda se encontravam bem estruturadas, não havendo a visualização de descontinuidades. Esse dado leva a crer que para uma eliminação mais eficaz com a droga em questão é necessário realizar a repetição dos procedimentos, objetivando atingir todas as camadas e células microbianas da estrutura analisada.

Para assegurar que os fármacos estavam realmente se agregando às amostras, realizou-se análises através da espectroscopia de absorbância através de um sistema com laser de diodo em 405 nm, acoplado ao monocromador (USB 2000 Ocean Optics, Dunedin , FL, estados Unidos) para coleta dos espectros de fluorescência. As curvas de absorbância estão representadas nas figuras 21 e 22, e evidenciam a presença dos fármacos nas amostras, assegurando que a falta de resultados satisfatórios não se deu devido a uma não agregação das substâncias com os biofilmes microbianos. As curvas presentes no intervalo de 400 – 600 nm referem-se às bactérias, e as representadas no intervalo de 650 – 700 nm referem-se à presença da Ftalocianina e seus derivados.

A presença dos fármacos nas amostras foi também evidenciada através da microscopia confocal a laser (MCL), realizada em Microscópio Confocal invertido (Zeiss LSM 780, Zeiss, Jena, Alemanha) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), com excitação em 405 nm através de um laser de diodo. A aquisição da fluorescência foi feita por meio de dois detectores, um para região do verde e outro para região do vermelho (Figuras 21 e 22). Nessas figuras, tem-se representado na coloração verde as bactérias, e em vermelho a Ftalocianina, sendo facilmente observado que a fixação/presença do fármaco foi muito mais intensa quando se utilizou a carga

catiônica associada (maior densidade da coloração avermelhada nas imagens), indo em concordância com as curvas de absorbância obtidas, onde também uma maior concentração do fármaco catiônico é evidenciada.

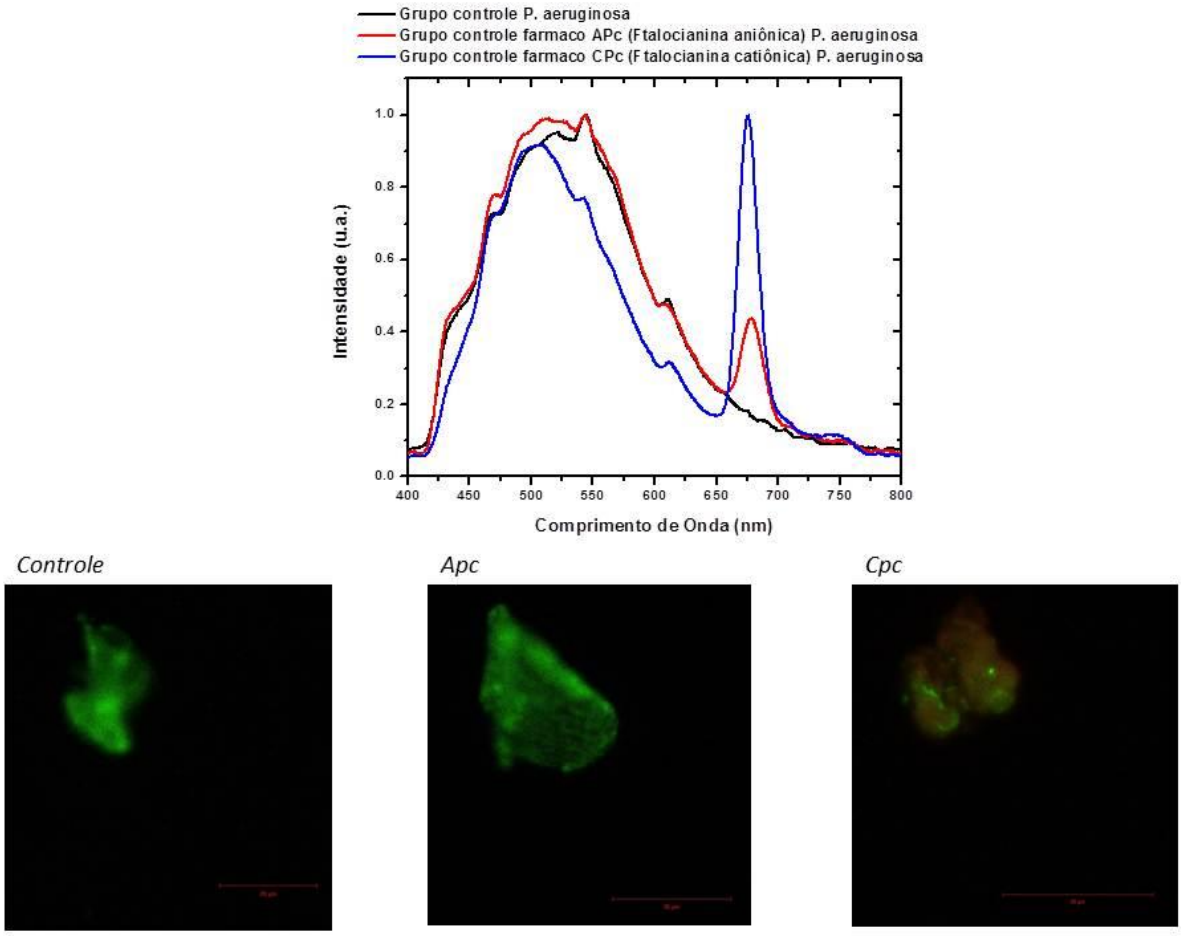

Figura 21: A figura traz o gráfico de espectroscopia de absorbância das amostras de *P. aeruginosa* com Ftalocianina aniônica e catiônica (APc e CPc), e do respectivo grupo controle (C). O pico observado nas amostras de APc e CPC entre 650 e 710 nm refere-se aos fármacos em questão, e não é observado na curva do grupo controle negativo. Entre os comprimentos de onda de 400 – 600 nm tem-se o espectro referente a presença dos microrganismo.

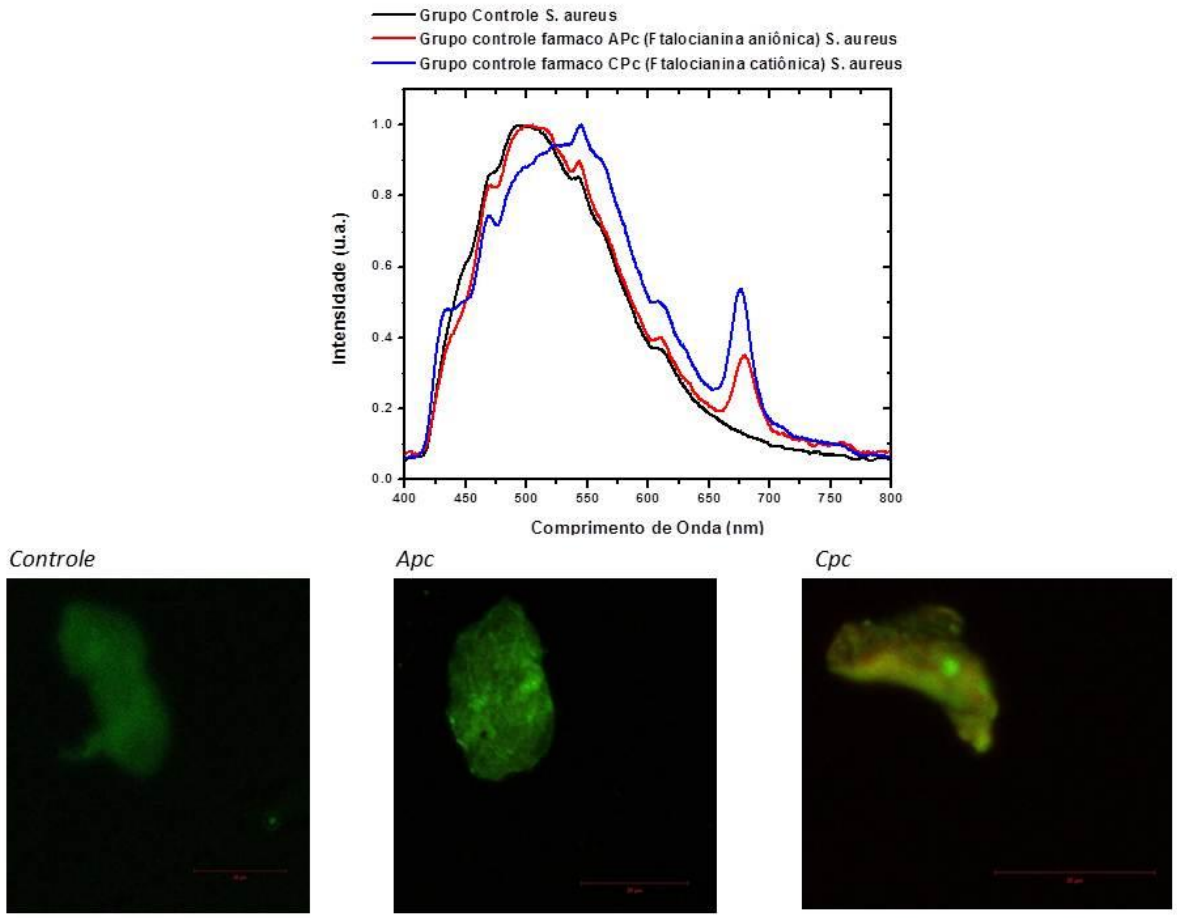

Figura 22: A figura traz a espectroscopia de absorbância das amostras de *S. aureus* com Ftalocianina aniônica e catiônica (APc e CPc), e do respectivo grupo controle (C). O pico observado nas amostras de APc e CPC entre 650 e 710 nm refere-se aos fármacos em questão, e não é observado na curva do grupo controle negativo. Entre os comprimentos de onda de 400 – 600 nm tem-se o espectro referente à presença dos microrganismo.

DISCUSSÃO GERAL:

Em relação à resposta bacteriana à irradiação laser, muito se tem pesquisado para determinar se de fato tem-se um efeito inibitório ou estimulatório desses microrganismos ao receberem esse tipo de excitação. Grande parte dos estudos clínicos sobre o assunto está concentrada nas áreas de odontologia e dermatologia, sendo os testes mais frequentes compostos de ensaios *in vitro*, com uma discussão pobre e não aprofundada sobre a modulação fenotípica do laser sobre a célula bacteriana [91; 92; 93; 94].

De maneira geral, tem-se que a resposta bacteriana à irradiação laser depende diretamente de parâmetros como comprimento de onda, intensidade e dose energética utilizados, assim como das condições de cultivo do microrganismo. Semelhante ao tecido biológico, evidências experimentais apontam para uma taxa de crescimento bacteriano modulada pela ativação da cadeia respiratória, gerando rapidamente um gradiente de pH através da membrana do microrganismo, havendo, então, um estímulo à divisão celular precoce [93; 95]. Desta forma, acredita-se que dependendo do objetivo da irradiação laser (efeito estimulatório ou inibitório) o comprimento de onda selecionado e a dose energética devem ser adequados, como por exemplo, em casos de infecções de tecidos moles, tanto para levar a uma regeneração eficaz da lesão, quanto para inativar o microrganismo. Tal situação torna o uso do laser mais complexo, pois o que se tem na literatura é a chamada "janela terapêutica" que preconiza que uma resposta tecidual ideal se dá entre 600 – 850 nm, comprimentos de onda estes que nem sempre apresentam ação inibitória para todos os microrganismos.

Nussbaum *et al* (2002) [93] compararam os efeitos da LILT em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com diferentes comprimentos de onda. As bactérias foram cultivadas em ágar e irradiadas com laser 630, 810 e 905 nm, seguindo-se um período de incubação de 20 horas. Com o comprimento de onda de 810 nm, os autores

observaram que houve um crescimento de todas as espécies de microrganismos utilizados. A inibição de todas elas foi observada apenas com a irradiação laser 630 nm. Dadras *et al* (2006)[6] irradiaram *in vitro* cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com laser de baixa intensidade com comprimentos de onda de 514, 532 e 633 nm. De maneira geral, com as doses utilizadas, os autores observaram uma ação inibitória da *Staphylococcus aureus* e estimulatória da *Pseudomonas aeruginosa* após irradiação com os lasers selecionados. A inativação da *Pseudomonas aeruginosa* se deu apenas com a associação dos fármacos fotossensíveis Azul de Toluidina (TBO) e safranina O (SO), e fotoativação com laser 633 nm e 532 nm, respectivamente.

No presente trabalho, apenas com a irradiação laser vermelho com dose de 35 J/cm^2, resultados satisfatórios para a inativação da *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram conseguidos apenas no grupo experimental com *P. aeruginosa*, em biofilmes mais maduros de 72 horas. Em biofilmes de 24 horas de ambos os microrganismos e de 72 horas de *S. aureus*, não se obteve resultados satisfatórios, apresentando o laser uma leve ação estimulatória da proliferação bacteriana. Desta forma, com o comprimento de onda de 670nm e com a dose energética aplicada, os resultados obtidos mostraram que a simples aplicação de laser não representa um recurso viável quando em presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mesmo sendo o laser e a dosagem adequados para a regeneração tecidual, estando portanto dentro da "janela terapêutica".

A associação de uma substância fotossensível, como feito no trabalho de Dadras *et al* (2006)[6] visando a inativação eficaz de microrganismos, no presente trabalho, se deu através da Ftalocianina cloro-alumínio, com 4 diferentes formulações. Resultados positivos foram alcançados apenas com a associação de uma carga positiva (FCV e FCPc) às substâncias quando

aplicadas em biofilmes de 24 horas de formação tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Pseudomonas aeruginosa*. Em biofilmes de 72 horas, observou-se um comportamento contrário, apresentando as formulações catiônicas uma eficácia não satisfatórias, sendo alcançados resultados inibitórios apenas com a formulação catiônica com Ftalocianina (FCPc) para a *S. aureus* e com a formulação aniônica com Ftalocianina para a *P. aeruginosa*.

Tanto em biofilmes de 24 horas quanto de 72 horas resultados positivos foram mais facilmente conseguidos ao se associar não apenas a carga positiva às formulações, mas também o tensoativo Poloxamer teve grande importância durante todo o processo. Esta substância foi capaz de melhorar a interação do fármaco com as amostras, potencializando o processo de desestruturação da membrana bacteriana, e levando a uma melhor interação do fármaco com a luz laser, possibilitando a fotoativação, a qual estaria prejudicada na ausência do mesmo, uma vez que as moléculas de Ftalocianina agregam-se facilmente entre elas, impedindo uma melhor interação com o estímulo luminoso aplicado.

Na literatura, a utilização da FC-ClAl para inativação de microrganismos não é facilmente encontrada, assim como seus mecanismos de ação sobre a célula bacteriana ainda não estabelecidos. Desta forma, uma comparação eficaz com a literatura existente dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais fica limitada, podendo-se apenas conflitar sua eficácia aos fotossensibilizadores amplamente utilizados atualmente para essa finalidade, que são o Azul de Toluidina (AT) e o Azul de Metileno (AM).

Apesar da falta de uniformidade metodológica nos trabalhos encontrados com o uso do azul de toluidina (AT), o que dificulta a avaliação e comparação dos resultados alcançados, essa substância tem apresentado efeitos positivos para a inativação de microrganismos tanto em

experimentos *in vitro* quanto *in vivo* [96; 97]. Classificado como corante fenotiazínico, esta substância é composta por um sistema de anel aromático tricíclico planar (figura 23), apresentando uma faixa ótima de fotoativação na faixa que vai de 620 – 660 nm, localizando-se, portanto, na chamada "janela terapêutica", com ótima penetrabilidade no tecido biológico, assim como produção satisfatória de oxigênio singleto [98].

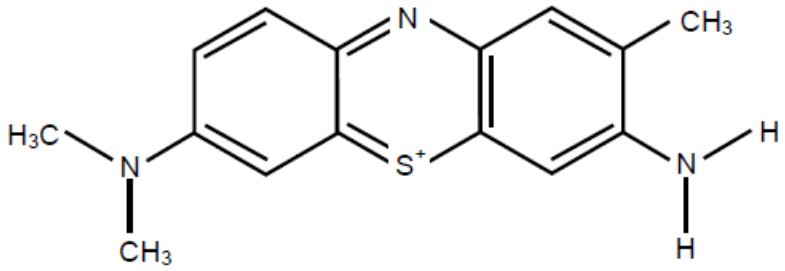

Figura 23: Estrutura química do Azul de Toluidina (AT)

Duas hipóteses tentam explicar o mecanismo pelo qual o AT leva à morte celular, sendo elas: transferência de energia da molécula excitada do corante para as moléculas de oxigênio e/ou transferência direta de elétrons entre corante e biomoléculas, resultando ambos os processos na formação do oxigênio singleto, o qual determina a destruição celular [99].

Também classificado como um corante fenotiazínico, o azul de metileno (AM) tem sido apontado como eficaz para a eliminação de microrganismos [100] e é amplamente aplicado para a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) [101; 102; 103]. Esta substância apresenta uma estrutura linear tricíclica e heteroaromática (Figura 24), e, semelhante aos outros fotossensibilizadores fenotiazínicos, apresenta uma maior eficácia contra bactérias Gram (+) [43; 99]. Seu comprimento de onda de máxima absorção é de 660 nm, possuindo uma boa penetração nos tecidos biológicos

com uma baixa toxicidade e boa ação microbiana [101; 104].

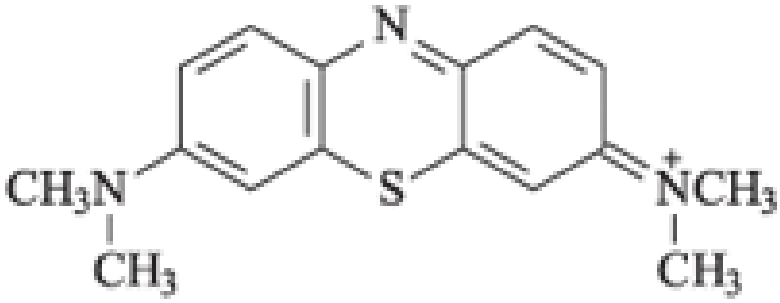

Figura 24: Estrutura química do Azul de Metileno (AM)

O AM é um fotossensibilizador catiônico, apresentando uma ligação eletrostática na superfície externa da célula alvo, levando a um dano inicial à sua parede e induzindo a uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias [43; 44; 105; 106]. Esse dano inicial à membrana celular observado com o uso do AM que apresenta uma carga positiva foi também observado com o uso das formulações catiônicas com Ftalocianina onde, mesmo antes da fotoativação do fármaco, foram observadas, macroscópica e microscopicamente, alterações estruturais no biofilme formado nos poços experimentais. No caso de biofilmes mais maduros, essa ação desestruturante não foi capaz de determinar a inativação microbiana, não sendo, portanto, observado uma redução no número de bactérias após a aplicação de PACT / FC – ClAl. Resultados positivos com carga catiônica em biofilmes de 72 horas foram visualizados apenas no grupo com *S. aureus*.

A matriz extracelular protege as células microbianas da ação de biocidas e de produtos tóxicos, além de garantir a coesão das células no interior do biofilme e permitir a associação com outros microrganismos [107]. O biofilme mais maduro também permite que as bactérias que estão crescendo dentro do biofilme desenvolvam diferenças fenotípicas, bioquímicas e morfológicas que as diferenciam das que se encontram na forma planctônica. Desta forma, é frequente

encontrar bactérias de uma mesma comunidade de biofilme com diferentes doses inibitórias mínimas a medicamentos, determinando diferentes índices de resistência à ação de fármacos, possibilitando a permanência de patógenos oportunistas como agentes infectantes por tempo prolongado [108].

Desta forma, pode-se teorizar que a evidente menor ação da PACT em biofilmes mais maduros esteja relacionada a uma melhor estruturação da EPS, a qual protege e dá melhores condições para as bactérias desenvolverem uma maior resistência contra a ação da terapia aplicada.

Visando comparar a eficácia da PACT com o uso do AT (aniônico) e do AM (catiônico), Usacheva *et al*. (2001) [101], utilizando tanto cepas Gram (+) quanto Gram (–) e irradiações laser 630 nm e 664 nm, avaliou os resultados obtidos com e sem a fotoativação das amostras. Nas condições estudadas e com os comprimentos de onda selecionados, os resultados apontaram para uma maior eficácia do azul de metileno para a eliminação das bactérias. Os mesmos autores também variaram a concentração dos fármacos visando analisar uma maior eficácia ou não do tratamento proposto e observaram que, em altas concentrações, mesmo sem a exposição à luz, houve um efeito bactericida contra ambas as bactérias Gram (+) e Gram (-). Situação semelhante foi observada no presente trabalho onde as substâncias catiônicas mostraram uma maior eficácia do que as aniônicas para a inativação microbiana, ambas com a mesma formulação, diferindo apenas em sua polaridade. Em relação à concentração do fármaco utilizado, testes pilotos do presente projeto também apontaram para uma situação semelhante, onde uma maior quantidade de fármaco utilizado levou a uma maior eficácia bactericida das formulações catiônicas contra ambos os microrganismos utilizados, mesmo na ausência da fotoativação laser. Porém, devido a uma alta taxa de toxicidade fibroblástica já na concentração de 5µmol/mL, optou-se por não

utilizar formulações mais concentradas, uma vez que tal situação inviabilizaria sua utilização *in vivo*, por possivelmente levar a um aumento da área lesionada.

Diferentemente do observado nos resultados obtidos após a utilização da PACT com Ftalocianina cloro-alumínio aniônica, o uso de AT para a eliminação de bactérias mostrou resultados positivos para a inativação microbiana como no trabalho de Zanin *et al* (2005) [109] que utilizando PDT com AT e fotoativação laser e LED, obtiveram resultados positivos para eliminação eficaz de *S. mutans*, reduzindo sua susceptibilidade em 99,99%. Os autores também observaram que biofilmes mais maduros são menos susceptíveis a PDT, resultado este que está em concordância com o observado no presente trabalho, onde em biofilmes de 72 horas não se observou resultados satisfatórios como os observados em biofilmes de 24 horas. Através da microscopia confocal, os mesmo autores observaram que o efeito letal da PDT ocorre predominantemente nas camadas mais externas dos biofilmes, como também observado nas análises de microscopia do presente estudo.

Tegos e Hamblim (2006) [103] investigaram a ação de três diferentes fenotiazínicos associados à luz vermelha para a inativação tanto de bactérias com as chamadas bombas multidrogas resistentes intactas (MDRs - Multidrug resistance), quanto sem essa proteína de membrana que determina o bombeamento para fora da célula da substância fotossensível (e outros tipos de drogas), processo esse que possivelmente reduz sua ação por determinar uma menor concentração dessa substância no meio intracelular. Os resultados obtidos mostraram uma maior eficácia dos fenotiazínicos entre os microrganismos sem as MDRs quando comparados a espécies selvagens, com todas as estruturas membranares presentes. Desta forma, os autores concluíram que para uma melhor ação bactericida dessas substâncias fotossensíveis seria interessante combinar inibidores de MDRs nas formulações utilizadas, aumentando sua eficácia. Essa proposta poderia ser também utilizada com as formulações de Ftalocianina cloro-alumínio,

como uma maneira de investigar se a ausência de resultados positivos com esta droga está relacionada também a esse bombeamento da substância para fora da célula bacteriana, o que determinou essa reduzida ação para inativação microbiana.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a possibilidade de se conseguir, através da irradiação laser associada a um fotossensibilizador (Ftalocianina cloro-alumínio), uma resposta positiva para a eliminação eficaz de agentes patogênicos, permitindo, futuramente, a associação do estímulo do reparo tecidual através da luz laser, com a eliminação de microrganismos que frequentemente se fazem presentes em úlceras dérmicas, crônicas ou não. O trabalho de Grupta *el al*., 2012 [50] traz uma revisão sobre as vantagens e desafios de se associar a luz lazer (LLLT), a PDT / PACT e a nanotecnologia para determinar uma cicatrização eficaz, uma desinfecção satisfatória e uma boa interação do fármaco com o tecido alvo indesejado (microrganismos, células cancerosas), potencializando a sua eliminação.

Os resultados obtidos nesse trabalho em relação ao uso da Ftalocianina cloro-alumínio associada à luz laser vermelha e ao tensoativo Poloxamer (nanotecnologia esta utilizada para otimizar a interação do fármaco com a luz), permitiram concluir que:

- Metodologia: a pré-lavagem realizada na quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana com Ftalocianina Cloro-Alumínio (PACT /FC-ClAl) não mostrou ter interferência nos resultados finais dos experimentos. A redução de microrganismos nos grupos pós-lavagem só foi observada nos grupos experimentais com a *Pseudomonas aeruginosa* que receberam os fármacos, apontando para uma ação da droga, e não da metodologia**.** Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais com *Staphylococcus aureus*, mesmo com a utilização

das formulações com Ftalocianina Cloro-Alumínio. Foi possível também observar uma ação bactericida das substâncias testadas, encorajando a realização de análises mais detalhadas para averiguar se esse resultado se mantém com biofilmes mais maduros e se é mais eficaz com substâncias outras associadas à Ftalocianina Cloro-Alumínio.

- Eficácia dos fármacos utilizados: a eficácia maior se deu com a utilização das substâncias associadas ao tensoativo Poloxamer e à carga positiva, não havendo evidências de uma grande relevancia da presença da Ftalocianina nessas formulações. Entretanto, como apenas a análise da Ftalocianina não é viável por essa substância agregar com facilidade e impossibilitar a fotoativação laser, considera-se importante a continuidade dos procedimentos experimentais, desta vez com biofilmes mais maduros, avaliando melhor a sua real eficácia.

- Biofilmes mais maduros: de maneira geral, os resultados mostraram que não é vantajosa a aplicação do tratamento proposto em casos de biofilmes mais maduros e bem estruturados, havendo a necessidade de se adequar as substâncias para uma maior eficácia da Ftalocianina cloro-alumínio quando se tem uma estrutura mais complexa protegendo as bactérias contra a ação da PACT.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A FC-ClAl não apresenta ação bactericida satisfatória sobre a *P. aeruginosa* e a *S. aureus*, não possibilitando uma eliminação eficaz de ambos os microrganismos.

- A dose energética de laser utilizada, a qual é ideal e satisfatória para a proliferação fibroblástica, não demonstrou ser eficaz para a fotoativação da Ftalocianina e consequente eliminação de *P. aeruginosa* e *S. aureus.*

- A ação antimicrobiana só foi observada ao se ter a associação da FC-ClAl com uma carga positiva (formulação catiônica), a qual mostrou intensa interação com os biofilmes microbianos, principalmente com a *S. aureu.*

- A PACT com Ftalocianina cloro-alumínio associada a uma carga positiva demonstrou ser eficaz para ocasionar danos à estrutura dos biofilmes de ambos os microrganismos testados, possivelmente tornando essa estrutura mais susceptível a outro tipo de terapia (medicamentos), e levando a uma desinfecção satisfatória da superfície/lesão tratada.

SUGESTÕES

- Estudos mais aprofundados com a Ftalocianina cloro-alumínio devem ser feitos para se determinar tanto a interação microscópica com as estruturas da membrana/parece celular bacteriana, assim como seus possíveis efeitos no metabolismo microbiano, possibilitando um ajuste das formulações para a obtenção de resultados satisfatórios para a inativação bacteriana.

- A busca por um estímulo laser mais adequado tanto para o processo cicatricial quanto para a inativação bacteriana, com a presença do fármaco em questão, também seria de grande importância.

REFERÊNCIAS[1]

(1 De acordo com norma da ABNT – ordem de citação)

[1] PEREIRA, G. F. M. Inativação fotodinamica de microganismos. **Química Nova,** v. 30, n. 4, p. 988 - 994, 2007.

[2] WOODRUFF, L. D. et al. The Efficacy of Laser Therapy in Wound Repair: A Meta-Analysis of the Literature. **Photomedicine and Laser Surgery,** v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.

[3] ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence*. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

[4] SCHMIDTCHEN, A. et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactive the antibacterial peptide LL-37. **Molecular Microbiology,** v. 46, n. 1, p. 157-168, 2002.

[5] GUFFEY, J. S.; WILBORN, J. Effects of Combined 405-nm and 880-nm Light on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in Vitro. **Photomedicine and Laser Surgery,** v. 24, n. 6, p. 680-683, 2006.

[6] DADRAS, S. et al. Different photoresponses of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro. **Curr Microbiol,** v. 53, n. 4, p. 282-6, Oct 2006.

[7] JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

[8] PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova,** v. 30, n. 4, p. 988 - 994, 2007.

[9] SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova,** v. 25, n. 5, p. 801 - 807, 2002.

[10] JORI, G.; FABRIS, C. Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 43, n. 3, p. 181-185, 1998.

[11] GOMES, E. R. et al. Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. **Cell Biology and Toxicology,** v. 15, n. 4, p. 249-260, 1999.

[12] FABRIS, C. et al. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. **Cancer Research,** v. 61, n. 20, p. 7495-7500, October 15, 2001.

[13] MILLER, J. D. et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 224, n. 3, p. 290-299, 2007.

[14] LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 94, n. 2, p. 143-146, 2009.

[15] BAI, L. et al. The Relationship of Phthalocyanine 4 (Pc 4) Concentrations Measured Noninvasively to Outcome of Pc 4 Photodynamic Therapy in Mice. **Photochemistry and Photobiology,** v. 85, n. 4, p. 1011-1019, 2009.

[16] SILVA, J. C. E. et al. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 34, n. 5, p. 451-457, 2004.

[17] MENDEZ, T. M. et al. Dose and wavelenght of laser have influence on the repair of cutaneous wounds. **J Clin Laser Med Surg,** v. 22, n. 1, p. 19 - 25, 2004.

[18] KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. **A review of low level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards**. Physiotherapy. 77**:** 161 - 170 p. 1991.

[19] MAILLET, H. **O laser – princípios e técnicas de aplicação**. Ed Manole, 1987.

[20] LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3. Barueri - SP: Ed Manole, 2001.

[21] KITCHEN, S. S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: 1996.

[22] TUNÉR, J.; HODE, L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background** Sweden: 1999.

[23] GREATHOUSE, D. G.; CURRIER, D. P.; GILMORE, R. L. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. **Phys Ther,** v. 65, n. 8, p. 1184-7, Aug 1985.

[24] BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: 1997.

[25] LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. **Quality of light: is laser necessary for effective photobiostimulation?** : Australian Journal Physiotherapy. 39**:** 87 - 92 p. 1993a.

[26] KARU, T. I. et al. **Effects of near-infrared laser and superluminous diode irradiation on *Escherichia Coli* division rate** IEEE Journal of Quantum Electronics. 26**:** 2162 - 2165 p. 1990.

[27] KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. **A review of low level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards**: Physiotherapy. 77**:** 161 - 170 p. 1991.

[28] MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med,** v. 5, n. 1, p. 31-9, 1985.

[29] ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med,** v. 29, n. 2, p. 179-84, 2001.

[30] KARU, T. **Photobiological fundaments of low-power laser therapy.**: IEEE journal of Quantum electronics QE 23**:** 1703 - 1717 p. 1987.

[31] KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. **Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro** Journal of Photochemistry and Photobiology. 27**:** 219 - 223 p. 1995.

[32] KARU, T. I. **The science of low-power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

[33] MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. **Ultraestructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria.** : Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 38**:** 25 - 30 p. 1997.

[34] PASSARELLA, S. et al. **Increase of proton eletrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser**: FEBS. 175**:** 95 - 99 p. 1984.

[35] SANDOVAL - ORTIZ, M. C. et al. **Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades - Parte 1**: Fisioterapia Brasil. 2**:** 221 - 240 p. 2001.

[36] TUNER, J.; HODE, L. **It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low level laser therapy**: Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery. 16**:** 245 - 248 p. 1998.

[37] TAGUCHI, Y. **Thermographic changes following laser irradiation for pain relief:** 143 - 146 p. 1991.

[38] RAAB, O. **On the effect of fluorescent substances on infusoria**: Z Biol. 39**:** 524 - 526 p. 1900.

[39] TEDESCO, A. C. **Processos Fotodinâmicos: "A luz" de uma nova terapia aplicada à saúde humana**: Jornal Brasileiro de Laser. 1**:** 32 - 41 p. 2007.

[40] SIMPLICIO, F. I.; MAIONCH, F.; HIOKA, N. **Terapia Fotodinamica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos**: Química Nova. 25**:** 801 - 807 p. 2002.

[41] PERUSSI, J. R. **Inativação fotodinâmica de microrganismos**: Química Nova. 30**:** 988 - 994 p. 2007.

[42] MARTIN, J. P.; LOGSDON, N. **The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *Escherichia coli* B**: J Biol Chem. 262**:** 7213 - 7219 p. 1987.

[43] WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother,** v. 42, n. 1, p. 13-28, Jul 1998.

[44] JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **J Environ Pathol Toxicol Oncol,** v. 25, n. 1-2, p. 505-19, 2006.

[45] MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med Sci,** v. 22, n. 2, p. 83-91, Jun 2007.

46 GOMES, A. J. et al. Photobiological and Ultrastructural Studies of Nanoparticles of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Containing Bacteriochlorophyll-a as a Photosensitizer Useful for PDT Treatment. **Drug Delivery,** v. 12, n. 3, p. 159-164, 2005.

47 ZHU, F. et al. Trends in the exploration of anticancer targets and strategies in enhancing the efficacy of drug targeting. **Curr Miol Pharmacol.,** v. 1, n. 3, p. 213-32, 2008.

48 WIEDMANN, M. W.; CACA, K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. **Curr Pharm Biotechnol,** v. 5, n. 4, p. 397-408, Aug 2004.

49 ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Photofrin photodynamic therapy: 2.0 mg/kg or not 2.0 mg/kg that is the question. **Photodiagnosis Photodyn Ther,** v. 5, n. 2, p. 112-9, Jun 2008. ISSN 1873-1597 (Electronic).

50 GUPTA, A. et al. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. **Biotechnol Adv**, Aug 2012. ISSN 1873-1899.

51 ROSENTHAL, I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. **Photochemistry and Photobiology,** v. 53, n. 6, p. 859 - 870, 1991.

52 NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim Pol,** v. 52, n. 2, p. 339-52, 2005. ISSN 1734-154X (Electronic)

53 KETABCHI, A. et al. Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes. **Arch Oral Biol,** v. 43, n. 2, p. 143-9, Feb 1998.

54 AHMAD, N. et al. Involvement of Fas (APO-1//CD-95) during Photodynamic-Therapy-Mediated Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells. v. 115, n. 6, p. 1041-1046, 2000.

55 TOMAZINI, M. V. et al. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutanea, alterações histologicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. **An Bras Dermatol,** v. 82, n. 6, p. 535 - 541, 2007.

56 JIANG, F. et al. Angiogenesis Induced by Photodynamic Therapy in Normal Rat Brain¶. **Photochemistry and Photobiology,** v. 79, n. 6, p. 494-499, 2004.

[57] BOMBELLI, C. et al. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. **Mol Pharm,** v. 5, n. 4, p. 672-9, Jul-Aug 2008.

[58] ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature,** v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

[59] GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Cent Eur J Biol,** v. 2, p. 1-33, 2007.

[60] SCHNEIDER, T. et al. Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. **Science,** v. 328, n. 5982, p. 1168-1172, May 28, 2010 2010.

[61] YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews,** v. 55, n. 1, p. 27-55, March 1, 2003.

[62] GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. . **European Journal of Biochemistry,** v. 268, n. 21, p. 5589-5600, 2001.

[63] DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Letters,** v. 501, n. 2-3, p. 146-150, 2001.

[64] CHEN, Y. et al. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of {alpha}-Helical Antimicrobial Peptides. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 51, n. 4, p. 1398-1406, April 1, 2007 2007.

[65] MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica**. Química Nova. 24**:** 87-93 p. 2001.

[66] SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. **Ambientes micelares em química analítica**. Química Nova. 24**:** 87-93 p. 2001.

[67] NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**: Química Nova. 25**:** 772 - 776 p.

[68] COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol,** v. 41, p. 435-64, 1987.

69 LAWRENCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **J. Bacteriol.,** v. 173, n. 20, p. 6558-6567, October 1, 1991.

70 BELLON, J. M. et al. In vitro interaction of bacteria with polypropylene/ePTFE prostheses. **Biomaterials,** v. 22, n. 14, p. 2021-4, Jul 2001.

71 DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev,** v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.

72 MEHROTRA, M. D. A. Bacterial biofilms. **Pediatric Asthma, Allergy & Immunology,** v. 20, n. 3, p. 191 - 195, 2007.

73 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis,** v. 8, n. 9, p. 881-90, Sep 2002.

74 SAUER, K. et al. Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **J. Bacteriol.,** v. 184, n. 4, p. 1140-1154, February 15, 2002..

75 STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated comunities. **Rev Microbiol,** v. 56, p. 187 - 209, 2002.

76 ZANIN, I. C. J. et al. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **European Journal of Oral Sciences,** v. 114, n. 1, p. 64-69, 2006.

77 BJARNSHOLT, T. et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. **Wound Repair Regen,** v. 16, n. 1, p. 2-10, Jan-Feb 2008.

78 JAMES, G. A. et al. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen,** v. 16, n. 1, p. 37-44, Jan-Feb 2008.

79 FERRAREZE, M. V. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem,** v. 20, n. 1, p. 7 - 11, 2007.

80 KAYSER, F. H. Bacteria as human pathogens. In: Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Ackert, J.; Zinkernagel, R. M. **Medical Microbiology,** v. New York: Thieme, p. 229 - 345, 2005.

[81] MOREAU-MARQUIS, S.; STANTON, B. A.; O'TOOLE, G. A. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics,** v. 21, n. 4, p. 595-599, 2008.

[82] GJØDSBØL, K. et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **International Wound Journal,** v. 3, n. 3, p. 225-231, 2006.

[83] LOWY, F. D. Staphylococcus aureus Infections. **New England Journal of Medicine,** v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

[84] SIEPRAWSKA-LUPA, M. et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-Derived Proteinases. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 48, n. 12, p. 4673-4679, December 1, 2004.

[85] MILES, A. A.; MISRA, S. S. **The estimation of the bactericidal power of the blood**: Journal of Hygiene. 38**:** 732 - 749 p. 1938.

[86] KOULAOUZIDOU, E. A. et al. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. **Eur J Dent,** v. 3, n. 1, p. 3-9, Jan 2009.

[87] FERNÁNDEZ, M. R. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **Int Endod J,** v. 43, n. 2, p. 102-8, Feb 2010.

[88] NEPAL, P. R.; HAN, H. K.; CHOI, H. K. Enhancement of solubility and dissolution of coenzyme Q10 using solid dispersion formulation. **Int J Pharm,** v. 383, n. 1-2, p. 147-53, Jan 2010.

[89] ALI, W.; WILLIAMS, A. C.; RAWLINSON, C. F. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: poloxamer solid dispersions. **Int J Pharm,** v. 391, n. 1-2, p. 162-8, May 2010.

[90] ZHANG, L. et al. Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **J Control Release,** v. 85, n. 1-3, p. 73-81, Dec 2002.

[91] LAPOTKO, D. et al. Photothermal studies of modulating effect of photoactivated chlorin on interaction of blood cells with bacteria. **Cytometry,** v. 37, n. 4, p. 320-6, Dec 1999.

92 MERAL, G. et al. Factors affecting the antibacterial effects of Nd:YAG laser in vivo. **Lasers Surg Med,** v. 32, n. 3, p. 197-202, 2003.

93 NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm2 on three species of bacteria in vitro. **J Clin Laser Med Surg,** v. 20, n. 6, p. 325-33, Dec 2002.

94 SCHOOP, U. et al. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. **Lasers Surg Med,** v. 35, n. 2, p. 111-6, 2004.

95 TIPHLOVA, O.; KARU, T. Action of low-intensity laser radiation on Escherichia coli. **Crit Rev Biomed Eng,** v. 18, n. 6, p. 387-412, 1991.

96 HAAS, R. et al. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. **Clin Oral Implants Res,** v. 8, n. 4, p. 249-54, Aug 1997.

97 DÖRTBUDAK, O. et al. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res,** v. 12, n. 2, p. 104-8, Apr 2001.

98 WAINWRIGHT, M.; GIDDENS, R. M. **Phenothiazinium photosensitisers: choice in synthesis and application**: Dyes and Pigments. 57**:** 245 - 257 p. 2003.

99 BHATTI, M. et al. A study of the uptake of toluidine blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol,** v. 68, n. 3, p. 370-6, Sep 1998.

100 WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol,** v. 25, n. 2, p. 77-81, Aug 1992.

101 USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg Med,** v. 29, n. 2, p. 165-73, 2001.

102 _____. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **J Photochem Photobiol B,** v. 71, n. 1-3, p. 87-98, Oct 2003.

[103] TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 1, p. 196-203, Jan 2006.

[104] TEICHERT, M. C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,** v. 93, n. 2, p. 155-60, Feb 2002.

[105] GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 6, p. 2173-8, Jun 2004.

[106] PRATES, R. A. et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Photochem Photobiol B,** v. 86, n. 1, p. 70-6, Jan 2007.

[107] COSTERTON, J. W. et al. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol,** v. 176, n. 8, p. 2137-42, Apr 1994.

[108] ITO, A. et al. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. **Appl Environ Microbiol,** v. 75, n. 12, p. 4093-100, Jun 2009.

[109] ZANIN, I. C. et al. Susceptibility of Streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J Antimicrob Chemother,** v. 56, n. 2, p. 324-30, Aug 2005.

APÊNDICE

Apêndice A - Parâmetros de Biossegurança para uso do laser.

As fontes de lasers são divididas em quatro grupos, conforme o tipo de lesão que provocam nos olhos.

Os quatro grupos são numerados de I a IV.

CLASSE I - Trata-se de lasers de potência baixa, cujo perigo é moderado, porém não é aconselhável olhar diretamente para nenhum tipo de laser.

CLASSE II - Emitem radiação visível de baixa potência e provavelmente não prejudicam os olhos se não forem olhados diretamente durante mais de 0,25s ; 0,25s é o tempo de rejeição do olho à luz, que no caso é o tempo que o olho leve para piscar. Nas regiões visível e infravermelha próxima os lasers do grupo II emitem de 1uW a 1mW, aproximadamente conforme o comprimento de onda que varia de 400nm a 700nm. As classificações deixam uma margem de segurança razoavelmente grande, mas não convém olhar diretamente para o feixe emitido pelos lasers do grupo II.

CLASSE IIIa e IIIb - Provocam lesão no olho em menos de 0,25s. Os do grupo IV são os que apresentam níveis de radiação muito perigosos por reflexão difusa. Além disso, vários lasers do grupo IV chegam a produzir fogo ou emitir tanta potência que conseguem vaporizar qualquer material que usamos para bloquear o feixe, colocando no ar certos compostos químicos perigosos, como o de berílio, por exemplo. Com exceção dos lasers do grupo I, todos os outros precisam receber etiqueta de identificação para estabelecer o grupo a que pertencem.

No presente trabalho, foram tomadas todas as medidas de segurança como uso de óculos protetores para evitar danos aos olhos durante as aplicações da terapia laser (LLLT), e uso de um envoltório de filme plástico para evitar contaminação da ponteira aplicadora, e calibração dos equipamentos antes e depois de todos os procedimentos.