AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MECANISMOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Orientadora: Martha Simões Ribeiro

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais.

SÃO PAULO

2007

**Aos meus pais Aguinaldo e Edna pelo esforço,
dedicação e amizade que sempre demonstraram em cada
passo da minha vida, permitindo-me, a partir de muito
amor, carinho e incentivo, alcançar mais este objetivo.**

**Aos meus sogros Hideo e Dirce pela amizade,
carinho, apoio, exemplo e inspiração que sempre me deram.**

**Aos meus amores Sayuri e Aline. Vocês fazem tudo isso
valer a pena, por estarem junto a mim quando preciso e por
sempre acreditarem em mim.**

Dedico a vocês, não só este trabalho, mas todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A todos que me acompanharam pela paciência e compreensão durante a execução deste trabalho. Gostaria de citar algumas pessoas que, de forma especial, dedicaram seu tempo e conhecimento, possibilitando a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, meus infinitos agradecimentos pelos ensinamentos, confiança e orientação oferecidos a mim no decorrer desta importante etapa da minha vida profissional. À minha amiga Martha meu eterno agradecimento por todas as oportunidades que não seriam possíveis de serem concretizadas se você não acreditasse em mim e me desse seu apoio.

Ao Prof. Dr. Michael R. Hamblin por me acolher e permitir realizar este trabalho, disponibilizando seu laboratório e principalmente seus conhecimentos, possibilitando o engrandecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista, pela oportunidade de compartilhar idéias e sugestões. Sua colaboração foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nasser Daghashtanli, pela sua disposição, colaboração, boa vontade e por compartilhar ideias.

À Profa. Dra. Rosângela Itri, por abrir as portas de seu laboratório e dividir seus conhecimentos.

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell por sua colaboração desde o início.

Ao Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter por sua colaboração e pelas idéias sugeridas. Seus conselhos jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira brilhante pesquisador e pessoa exemplar, para todos que convivemos com você.

Ao Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Júnior, pelo exemplo e pela oportunidade de trabalhar no Centro de Lasers e Aplicações.

À Profa. Dra. Silvia C. Núñez, por sua dedicação e incentivo, meus eternos agradecimentos. À minha grande amiga Silvia, companheira de trabalho, incentivadora e exemplo de pesquisadora. Não poderia existir pessoa melhor para compartilhar esta jornada.

À Dra. Cíntia C. Santos e ao Dr. Ricardo Matsumoto por sua amizade e colaboração, dentro e fora da Odontologia.

À Profa. Dra. e amiga Daniela de Fátima Teixeira da Silva, por estar sempre próxima e disposta a colaborar com suas idéias e companheirismo dentro e fora da física.

Ao Prof. Dr. e amigo Anderson Zanardi de Freitas, pela colaboração, pelas discussões e apoio.

À Helena Junqueira, pela paciência e colaboração.

A todos meus colegas de laboratório que sempre acreditaram e torceram pelos bons resultados desta pesquisa. Ao Aécio, Karin, China, Renato, Cris, Tatiana, Stella, Ricardo, Daniel e às nossas queridas agregadas Ilka e Melissa, pela colaboração, incentivo e pelos bons momentos vividos no escritório.

A todos os colegas desta jornada, Valdir, Luciano, Walter, Adriana, Cassius, Patrícia, Renata, Claudinha, Thiago, Felipe, Carol, meu muito obrigado.

Aos colegas do laboratório na Universidade de Harvard que me receberam e me apoiaram; George, Pawel, Ana, Marina, Tianhong e Tatiana, obrigado pelos momentos juntos e pela acolhida em Boston.

A todos os professores do CLA, pela ajuda e colaboração.

Aos funcionários do CLA, sempre tão atenciosos.

Ao IPEN, pela infra-estrutura oferecida, que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos os funcionários da divisão de ensino do IPEN.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Finalmente, aos meus amigos e aos que não são tão amigos assim, aos que acreditaram e aos que duvidaram deste trabalho, pois cada um à sua maneira, me incentivou e continua incentivando o meu crescimento profissional e pessoal.

A todos vocês, meu muito obrigado!

Mecanismos da Terapia Fotodinâmica em presença de H₂O₂

Aguinaldo Silva Garcez Segundo

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma promissora alternativa para sanificação de tecidos infectados. Entretanto, esta modalidade terapêutica apresenta diferenças quanto à sua eficiência sobre diferentes microrganismos, de acordo com sua morfologia e fisiologia. A associação de H₂O₂ e PDT pode aumentar a eficiência de ambos os tratamentos, principalmente em infecções provocadas por microrganismos Gram negativos. O objetivo deste trabalho é investigar o efeito antimicrobiano sinérgico existente na reação fotodinâmica em presença do peróxido de hidrogênio e esclarecer os mecanismos envolvidos neste processo fotobioquímico. O efeito fotodinâmico foi avaliado, *in vitro*, através da redução microbiana de três microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* na presença e ausência de H₂O₂, resultando no aumento de eficiência quando associada ao H₂O₂. Para elucidar os mecanismos envolvidos no aumento da redução microbiana observada, foram avaliadas, por detecção direta e indireta, a produção de superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete na presença de H₂O₂ e em sua ausência. Os resultados mostraram que na presença de H₂O₂ ocorre uma supressão nos mecanismos fotoquímicos, resultado em uma menor produção de espécies reativas de oxigênio. Comparando-se a redução bacteriana em *Escherichia coli* provocada pelo uso das terapias em separado, ou agindo em conjunto, e confrontando a quantidade de fotossensibilizador captado pelo microrganismo após condicionamento com H₂O₂ e após PDT, os resultados indicam que os mecanismos de ação da associação PDT e H₂O₂ podem ser bioquímicos. Os resultados obtidos mostram que em associação com H₂O₂, a PDT antimicrobiana tem sua eficiência aumentada, produzindo maior redução microbiana em diferentes microrganismos, entretanto, a dinâmica de formação de espécies reativas de oxigênio na presença do peróxido mostrou menor eficiência, tanto para reação tipo I como para reação tipo II. A avaliação dos mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo mostra que há um aumento da captação do fotossensibilizador pelo microrganismo após condicionamento prévio da célula com H₂O₂.

Mechanisms of Photodynamic Therapy in the presence of H₂O₂

Aguinaldo Silva Garcez Segundo

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy is a promising approach for tissue disinfection. However, this therapy does not have the same efficiency over different microorganisms, according to their morphology and physiology. The use of PDT associated to H₂O₂ could be able to improve the efficiency of both therapies and achieve better results, mainly over Gram negative infections. The aim of this study is to demonstrate the antimicrobial effect in the photodynamic reaction in the presence of H₂O₂ and clarify the mechanisms involved in this photo-chemical-biological process. The photodynamic process was evaluated, *in vitro*, through the microbial killing of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* in the presence and absence of H₂O₂. The association resulted in an improvement of the phototherapy when it was associated with H₂O₂. To elucidate the mechanisms responsible for the more efficient microbial killing, the process was directly and indirectly evaluated regard to the production of superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen when the photosensitizer was in H₂O or H₂O₂ solution. The results showed that in the presence of H₂O₂, the photo-chemical process was decreased and the production of reactive oxygen species was lower than expected. Comparing the microbial killing of *Escherichia coli* using the therapies alone or together and facing to the photosensitizer uptake after H₂O₂ incubation, the results indicated a biochemical mechanism instead a photochemical improvement. The data demonstrated that the association of H₂O₂ and antimicrobial PDT achieved higher microbial reduction over different microorganisms, but conversely than expected, the production of reactive oxygen species in the presence of H₂O₂ was lower for type I reaction and also for type II reaction. The evaluation of the biochemical mechanisms involved in this association showed an improvement in the photosensitizer uptake after previous conditioning of the cell with H₂O₂.

LISTAS DE FIGURAS E GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1 – Média da quantidade de O ₂ dissolvido nos solventes analisados	38
Gráfico 1: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca de cada fotossensibilizador	39
Tabela 2: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador	40
Gráfico 2: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador e do peróxido de hidrogênio	40
Tabela 3: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador e do peróxido de hidrogênio	41
Gráfico 3: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>S. aureus</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H ₂ O ₂	42
Tabela 4: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>S. aureus</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H ₂ O ₂	43
Gráfico 4: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>P. aeruginosa</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H ₂ O ₂	43
Tabela 5: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>P. aeruginosa</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H ₂ O ₂	44
Gráfico 5: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>C.albicans</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H ₂ O ₂	44
Tabela 6: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>C.albicans</i> resultante da toxicidade do azul de metileno em solução de H ₂ O ₂ e da PDT na ausência e	

na presença de três concentrações de H_2O_2	45
Gráfico 6: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>S. aureus</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	45
Tabela 7: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>S. aureus</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	46
Gráfico 7: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>P. aeruginosa</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	46
Tabela 8: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>P. aeruginosa</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	47
Gráfico 8: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>C. albicans</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	47
Tabela 9: Média e desvio padrão da redução microbiana de <i>C. albicans</i> resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2	48
Gráfico 9: Formação de oxigênio singlete pela irradiação do azul de metileno e azul de metileno associado a H_2O_2	49
Gráfico 10: Formação de oxigênio singlete pela irradiação do conjugado a base de clorina e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2	49
Gráfico 11: Formação de oxigênio singlete pela irradiação do conjugado a base de clorina e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2	50
Gráfico 12: Formação de superóxido pela irradiação do azul de metileno e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2	51
Gráfico 13: Formação de superóxido pela irradiação do conjugado a base de	

clorina e da associação deste fotossensibilizador a H_2O_2	52
Gráfico 14: Formação de radical hidroxila pela irradiação do azul de metileno e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2	53
Gráfico 15: Formação de radical hidroxila pela irradiação do conjugado a base de clorina e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2	53
Figura 1: Suspensão de <i>C. albicans</i> carregada de DCFH na presença de AM	55
Figura 2: Suspensão de <i>C. albicans</i> carregada de DCFH na presença de AM+ H_2O_2	55
Gráfico 16: Formação de espécies reativas de oxigênio pela irradiação do azul de metileno e deste fotossensibilizador associado a H_2O_2 no interior do fungo <i>C. albicans</i>	56
Gráfico 17: Espectroscopia de absorção do azul de metileno remanescente na solução após centrifugação e remoção das células	57
Gráfico 18: Captação de FS no interior das células avaliada pela intensidade de fluorescência do FS a base de clorina	58
Gráfico 19: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador	59
Tabela 10: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador	59
Gráfico 20: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando o conjugado a base de clorina como fotossensibilizador	60
Tabela 11: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando o conjugado a base de clorina como fotossensibilizador	60

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ALA - ácido aminolevulínico

AM – azul de metileno

AT – azul de toluidina

BHI – *Brain and Heart Infusion*

°C – graus Celsius

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

DCFH-DA - diacetato de diclorifluoresceína

DCF – diclorofluoresceína

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERO – espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe - ferro

FS – fotossensibilizador

g - gramas

GaAlAs – arseneto de gálio e alumínio

He-Ne – Hélio-Neônio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

J – joule

J/cm² – joule por centímetro quadrado

LED – *Light Emmiting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

M - molar

mg/kg – miligramas por quilo

mM – milimolar

mm – milímetro

mW – miliwatt

NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida

NaOH – hidróxido de sódio

NBT - cloreto azul de nitrotetrazolium

nm – nanometro

PACT – *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* (quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana)

PBS – *Phosphate Buffer Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PDT – *Photodynamic Therapy* (terapia fotodinâmica)

RNO - N,N dimetil-4-notrosoanilina

rpm – rotações por minuto

s – segundos

ufc – unidades formadoras de colônias

W – watt

µg/ml – microgramas por mililitro

µL – microlitro

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
1- INTRODUÇÃO	01
2- OBJETIVOS	04
3- REVISÃO DA LITERATURA	06
4- MATERIAIS E MÉTODOS	26
5- RESULTADOS	38
6- DISCUSSÃO	63
7- ESTUDOS FUTUROS ADICIONAIS	72
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 - INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do efeito fotodinâmico por Raab e von Taippener em 1900, sabe-se que diversos microrganismos podem ser eliminados pela associação de um fotossensibilizador não tóxico e uma fonte de luz ressonante. A Terapia Fotodinâmica (PDT) consiste na associação de um agente fotossensibilizante, normalmente exógeno, e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar morte (necrose ou apoptose) celular, utilizada em tratamento de tumores e morte microbiana.

O mecanismo de ação se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, como por exemplo o oxigênio, o fotossensibilizador ao retornar ao seu estado fundamental, transfere a energia ao substrato, formando espécies de vida curta e altamente reativas, como o oxigênio singleto, superóxidos e outros radicais livres de alta citotoxicidade, que podem provocar sérios danos ao microrganismos, via oxidação irreversível de componentes celulares. Vários autores relatam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular.^{1,2}

Apesar da descoberta da PDT ter ocorrido através de uma ação antimicrobiana, esta terapia tem sido utilizada, desde então, no tratamento de tumores. Entretanto, o rápido aumento do aparecimento de microrganismos resistentes a antibióticos, devido à automedicação ou prescrição inapropriada, um crescente interesse mundial tem surgido por terapias alternativas. A redução microbiana por PDT tem se mostrado eficiente em diversos microrganismos, mesmo nos que apresentam múltipla resistência a

antibióticos. Além disso, a PDT não apresenta até o presente momento indícios de que microrganismos possam desenvolver mecanismos de resistência a este tratamento.³

Por outro lado, a redução microbiana por efeito fotodinâmico, apesar de eficiente em diversas espécies, enfrenta desafios diferentes quando utilizada contra bactérias Gram positivas (Gram+), bactérias Gram negativas (Gram-), esporos bacterianos e fungos.⁴ De maneira geral, a literatura mostra que as bactérias Gram+ podem ser eliminadas por vários fotossensibilizadores e doses mais baixas de irradiação, do que bactérias Gram-, bactérias esporuladas e fungos. Isso se deve a diferenças estruturais nas membranas celulares destes microrganismos, e no caso dos fungos, devido ao maior volume do mesmo.^{4, 5}

As fenotiazinas, corantes dos quais faz parte o Azul de Metileno (AM), têm sido bastante empregadas para terapia fotodinâmica antimicrobiana^{1,6,7,8,9,10}. Este fotossensibilizador possui estrutura linear tricíclica e heteroaromática, e assim como outros fotossensibilizadores, as fenotiazinas são mais efetivas contra bactérias Gram+ do que outros microrganismos e possuem uma marcante ação contra vírus^{4,11} sendo utilizado em serviços de esterelização sanguínea, principalmente na Europa, para foto-desinfecção de plasma e sangue.^{12,13}

O peróxido de hidrogênio tem sido utilizado como agente antimicrobiano e antisséptico, em diversas áreas da Saúde, tanto humana como animal. Este composto age como um radical livre e forte agente oxidante, podendo matar microrganismos por danos ao DNA¹⁴.

A maior parte da ação fotodinâmica se apóia na tríade: fotossensibilizador, fonte de luz e presença de oxigênio; portanto, com o objetivo de potencializar sua ação, diversas variáveis já foram investigadas como: fracionamento da dose de luz¹⁵, concentração e agregação do fotossensibilizador, irradiância da fonte luminosa, entre outros¹⁶. A associação da PDT antimicrobiana e peróxido de hidrogênio para potencializar a morte microbiana já foi comprovada em trabalhos anteriores de nosso grupo e por outros trabalhos da literatura; entretanto, seu mecanismo ainda não foi devidamente compreendido.

2 - OBJETIVOS GERAIS

O efeito fotodinâmico ocorre e depende, parcialmente, da presença de oxigênio molecular. Portanto, a ação fotodinâmica poderia ter sua eficiência aumentada na presença de H_2O_2 , devido à instabilidade deste composto e por sua molécula ser facilmente decomposta em O_2 e H_2O . O aumento de O_2 disponível no meio poderia facilitar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), intensificando a morte microbiana.

Para tanto, os objetivos deste trabalho são: avaliar a redução microbiana por efeito fotodinâmico, na presença e ausência de H_2O_2 em diferentes microrganismos (bactérias Gram+, Gram- e fungos), utilizando dois diferentes FS e determinar os possíveis mecanismos envolvidos na reação fotodinâmica na presença de H_2O_2 .

Os objetivos específicos são:

- Investigar a concentração de O_2 na água destilada e em H_2O_2
- Investigar a redução microbiana, *in vitro*, utilizando o dois diferentes FS em solução aquosa ou em solução de H_2O_2
- Investigar, por detecção direta e indireta, os mecanismos fotofísicos e fotoquímicos da formação de ERO, por ação fotodinâmica, em solução aquosa ou em solução de H_2O_2
- Investigar os mecanismos fotofísicos e fotoquímicos da formação de ERO, por ação fotodinâmica, no interior de células, quando estas foram tratadas com FS em solução aquosa ou em solução de H_2O_2
- Investigar a captação do FS pela célula após condicionamento com H_2O_2

- Investigar os mecanismos bioquímicos de morte microbiana, alterando a sequência em que o microrganismo foi submetido à ação do FS, PDT ou do H_2O_2

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

3.1.1 – Histórico e microrganismos susceptíveis

O primeiro relato do uso de luz associada a um fotossensibilizador para a morte de microrganismos se deve a Raab e von Tappeiner, em 1900, quando os mesmos pesquisavam o efeito da acridina sobre cultura de paramécios. Os pesquisadores notaram que devido às condições não usuais de luminosidade no ambiente durante a realização do experimento, a associação de luz e da acridina foi letal para estes microrganismos.

Também em 1900, o neurologista francês Prime estava estudando os efeitos da administração oral de eosina em pacientes com epilepsia. O médico notou que um dos efeitos colaterais era o aparecimento de dermatite na pele dos pacientes expostos ao sol. Baseados nestas descobertas, von Tappeiner e o dermatologista Joudlbauer utilizaram a combinação de eosina tópica e luz branca para o tratamento de câncer de pele e, em 1907, estes pesquisadores publicaram um trabalho propondo o termo “Ação Fotodinâmica” para esta nova modalidade de tratamento. Os autores descrevem, já neste trabalho, a importância do oxigênio nas reações de fotossensibilização.

A busca por novos agentes fotossensibilizantes levou à descoberta de um grupo de substâncias conhecidas como porfirinas. Um destes compostos foi utilizado por Hausmann em 1911 para demonstrar o efeito letal da associação de hematoporfirina e luz branca sobre microrganismos, células sanguíneas e pele de rato. Estes achados fizeram com que diversos pesquisadores passassem a estudar fotossensibilizadores para utilização em oncologia e não mais no combate a microrganismos.

Os estudos seguintes com as porfirinas mostraram que a hematoporfirina e seus derivados era uma nova e importante ferramenta no diagnóstico e tratamento de tumores. Em 1975, Dougherty e colaboradores apresentaram o primeiro caso de sucesso na cura total de tumores em experimentos em animais.¹⁷

Outro fator que levou ao desinteresse pela PDT antimicrobiana foi a descoberta na década de 40 da penicilina e, principalmente, o uso em larga escala dos antibióticos durante a II Guerra Mundial. Estes medicamentos deram aos pesquisadores das áreas da Saúde a falsa impressão de que a batalha contra os microrganismos estava vencida. Entretanto, dois anos após o lançamento comercial da penicilina, foi relatado o aparecimento de cepas de microrganismos resistentes a esta medicação. O rápido e emergente aumento do número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos tem levado a uma crise mundial no tratamento de infecções. O aparecimento de cepas bacterianas multi-resistentes aos antibióticos pode estar levando ao fim, um período de tempo que compreende as últimas 4 décadas, conhecido como a “Era dos Antibióticos”. Isso tem levado os pesquisadores a concluir que um novo e alternativo mecanismo de ação antimicrobiana, com efeitos colaterais mínimos e, principalmente, que não leve ao surgimento de microrganismos resistentes, seja altamente desejável neste momento.^{18,19,20}

Durante a década de 90, como alternativa aos métodos convencionais de tratamento para infecções, diversos pesquisadores voltaram sua atenção ao uso da terapia fotodinâmica na redução microbiana.

Dobson e Wilson²¹, em 1992, analisaram *in vitro* a redução bacteriana de bactérias orais Gram+ e Gram- por fotossensibilização de biofilme formado

pelas espécies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Utilizando uma associação de diversos corantes e um laser de He-Ne em baixa intensidade, os autores concluíram que os FS azul de toluidina (AT) e azul de metileno (AM) foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias. Os FS ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina e hematoporfirina éster somente foram efetivos em sensibilizar alguns dos microrganismos. Os autores sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana.

Wilson *et al*, também em 1992²², testaram *in vitro*, vinte e sete compostos associados ao laser de He-Ne e sua capacidade de sensibilizar e eliminar as bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Os corantes AT, AM e cloreto azul B nas concentrações de 0,005% foram efetivos contra as quatro espécies de bactérias, quando associados a um tempo de exposição de apenas 30 s.

Wilson *et al*, em 1993²³, testaram *in vitro* diversos corantes na fotossensibilização de *S. sanguis*. Culturas da bactéria foram expostas a um laser de He-Ne em diferentes tempos de irradiação e associado a diferentes FS. Os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) viáveis mostraram que o AT, hematoporfirina éster, tionina e o AM foram eficazes em matar o microrganismo. Entretanto, verificou-se que os corantes hematoporfirina éster e AM eram tóxicos ao microrganismo na ausência do laser e que os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio e cristal violeta foram ineficazes nas condições utilizadas no estudo.

Já idealizando uma aplicação clínica dos achados de Wilson e colaboradores, em 1996, Soukos *et al*²⁴ avaliaram os efeitos fotodinâmicos *in vitro* da radiação laser vermelha e do AT sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e *S. sanguis*. O objetivo do trabalho foi avaliar o risco que a PDT representa para as células normais do paciente, isto é, se era possível eliminar as bactérias causadoras da lesão, sem provocar danos aos tecidos adjacentes. Os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de FS associadas ao laser em baixa intensidade provocava a morte bacteriana e não reduzia a viabilidade celular, indicando a segurança desta terapia para uso clínico.

Sailer *et al*, em 1997²⁵, correlacionaram a inativação fotodinâmica da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com a biossíntese de porfirina após incubação com ácido 5-aminolevulínico (ALA). Os autores verificaram a formação de porfirina endógena por espectroscopia de fluorescência e pela técnica de cromatografia de líquidos de alta performance e sugerem que a incubação com o ALA aumenta o acúmulo de protoporfirinas.

Walsh²⁶, revisando a literatura sobre o uso dos lasers em baixa intensidade em tecidos duros orais, descreveu a fotossensibilização de bactérias com o uso associado de lasers em baixa intensidade e FS apropriados, com absorção ressonante à emissão do laser. O autor sugeriu que esta técnica poderia ter aplicação potencial para redução bacteriana no interior de canais radiculares e bolsas periodontais como coadjuvante ao tratamento convencional.

Os estudos nesta área, principalmente na redução bacteriana de microflora oral, vinham ganhando importância na literatura e Wainwright, em 1998⁴, em um artigo de revisão da literatura, apresentou os mecanismos de

ação da terapia fotodinâmica sobre microrganismos, os diversos FS em uso, com destaque especial aos FS da classe das fenotiazinas, como o AM e AT. Apresentou também as perspectivas futuras da técnica e propôs o termo *photodynamic antimicrobial chemoteraphy* (PACT) ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana, diferenciando esta técnica da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de tumores.

Novos fotossensibilizadores estavam sendo estudados por diversos grupos ao redor do mundo e em 1998, Soukos estudou a associação de uma clorina (ce6) e uma poli-L-lisina para a terapia fotodinâmica antimicrobiana. O objetivo deste trabalho era testar a hipótese de que este composto seria mais eficiente na fotodestruição de bactérias orais Gram+ e Gram-, com mínimos efeitos deletérios a uma linhagem de células epiteliais. Os resultados mostraram que para a *P. gingivalis* o uso de composto fotossensibilizador com carga catiônica resultou em redução bacteriana de 99%, o conjugado com carga neutra 95% e o de carga aniônica apresentou apenas 76% de redução. Para o *Actinomyces Viscousis*, o conjugado catiônico apresentou redução de 99,99%, enquanto que a linhagem de células epiteliais (HCPC-1) permaneceu intacta. Os autores explicaram este resultado apontando que a captação seletiva do conjugado pela bactéria é significativamente maior (20 a 100 vezes) do que a captação pela célula. A clorina sozinha possui uma seletividade muito menor (5 a 20 vezes) comparada à mesma linhagem de células epiteliais²⁷.

Estudando microrganismos mais complexos do que bactérias procariontes, Jackson *et al*²⁸ investigaram, *in vitro*, a morte microbiana de *Candida albicans* (um fungo eucarionte) nas suas formas de levedura e hifa. Os autores utilizaram um laser de He-Ne em baixa intensidade, associado ao

corante AT. Avaliou-se nesse trabalho a concentração do corante, a energia de aplicação do laser e o tempo que o FS leva para ser absorvido pelo fungo (tempo de pré-irradiação). Os autores concluíram que a associação entre o laser e o FS resultou em substancial morte microbiana tanto na forma de hifa quanto na de levedura. Além disso, a morte microbiana é energia dependente e o tempo ótimo de pré-irradiação é o de 5 minutos para a forma de levedura, pois a forma de hifa não é influenciada pelo tempo de pré-irradiação. Este experimento mostrou que diferentes microrganismos respondem de maneira particular à PDT e que a adequação dos parâmetros utilizados é uma condição necessária à redução microbiana para diferentes espécies.

Já nos anos 2000, os estudos de diferentes FS e diferentes fontes de luz continuavam a ser um assunto recorrente nas pesquisas, mas estes deixavam de ser experimentos laboratoriais em placas de Petri para começarem a ser estudos em condições mais próximas da clínica, como estudos em animais. Kawamoto *et al*²⁹ estudaram, *in vivo*, o efeito antibacteriano do laser de He-Ne de emissão amarela associado ao corante violeta cristal em abscessos subcutâneos em rato provocados pela bactéria *P. gingivalis*. Após uma semana, as amostras dos locais onde foram inoculados os cones de papel infectados foram analisadas histologicamente. Os resultados mostraram que o número de células inflamatórias foi grande nos grupos FS e bactéria, foi menor no grupo laser e menor ainda no grupo controle, onde não foi inoculada a bactéria.

Mostrando um amadurecimento nesta terapia, Silbert *et al*³⁰ avaliaram, *in vitro*, o potencial da terapia fotodinâmica em reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares, em uma situação prévia ao uso clínico, já

antevendo as adequações desta terapia a uma situação real de uso. Uma série de canais radiculares foi preparada por instrumentação mecânica. As raízes dos dentes, após serem esterilizadas, foram divididas em dois grupos e contaminadas. Um dos grupos recebeu intra-radicularmente uma solução de cultura de *Streptococcus mutans* e o outro grupo uma solução de cultura de *Enterococcus faecalis*. Os autores utilizaram um laser de diodo de InGaAlP ($\lambda = 670$ nm e de 3.5 mW de potência), com sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro 600 μ m, associado ao corante AM. As raízes foram irradiadas por períodos de tempo que variaram de 30s a 240s. Os resultados mostraram que o corante sozinho conseguiu redução bacteriana de 20%; somente a irradiação laser não alterou a população bacteriana. A irradiação laser provocou um aumento de temperatura que não foi superior a 0,5° C. O corante associado à irradiação laser por 240s eliminou todas as bactérias do grupo de raízes contaminado com *S. mutans*, entretanto, o mesmo tempo de irradiação somente conseguiu eliminar 40% das bactérias dos canais contaminados com *E. faecalis*. Os autores concluíram que a PDT pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, porém, os parâmetros devem ser ajustados para que se consiga a eliminação de bactérias como *E. faecalis*.

Em 2006, Maisch³¹ alertou sobre o aumento do número de microrganismos resistentes a antibióticos e que novas terapias deveriam ser desenvolvidas em um futuro próximo, sugerindo que a PDT antimicrobiana poderia ser uma alternativa ao uso de antibióticos e antimicrobianos, principalmente em aplicações tópicas. O autor revisou a literatura e indicou que áreas como dermatologia, no tratamento de feridas infectadas (principalmente com cepas resistentes de *Staphylococcus*), acne, psoríases e infecções

cutâneas por fungo; em gastroenterologia, para o tratamento de úlceras gástricas provocadas por *Helicobacter pylori* e em odontologia para a redução microbiana de microrganismos relacionados à cárie, doença periodontal e peri-implantites, a PDT antimicrobiana já é considerada uma promissora nova modalidade de tratamento.

Garcez e colaboradores³², em 2007, utilizando o conjugado do fotossensibilizador clorina(e6) e polietilenimina (PEI) e um laser de diodo de $\lambda = 660\text{nm}$, compararam a redução microbiana alcançada pelo tratamento endodôntico convencional (preparo químico-mecânico), pela PDT e pela terapia endodôntica associada à PDT antimicrobiana. Os canais radiculares foram contaminados com bactérias bioluminescentes permitindo uma análise em tempo real dos resultados. Os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, ambos bactérias Gram-, foram incubados por 72 h a 37° C, permitindo a formação de um biofilme no interior dos canais. Os resultados mostraram que o tratamento endodôntico promoveu uma redução bacteriana de 90%, a PDT reduziu 95% das bactérias e a associação dos tratamentos resultou em 98% de redução. Mais significativo do que a redução microbiana alcançada, a análise da recolonização dos canais após 24 h, mostrou que a combinação dos tratamentos foi mais efetiva que os tratamentos em separado.

3.1.2 Fotossensibilizadores e Mecanismos

Ovchinnikov e Tuchin³³, em 2001, estudaram em situações clínicas e pré-clínicas, o uso da terapia fotodinâmica em microrganismos da cavidade oral, com capacidade de gerar lesões infecciosas. Os autores testaram

diferentes concentrações do corante AM associado a um laser de He-Ne em culturas de espécies de *Staphylococcus*. Os autores concluíram que a concentração de 0.1% do AM foi a concentração que apresentou os melhores resultados, sem que esta concentração fosse tóxica para as bactérias ou para as células gengivais dos pacientes. Os autores preconizaram também o tempo de pré-irradiação de 3 minutos, pois, segundo eles, este tempo é clinicamente aceitável para o paciente e para o clínico. Tempos superiores a este poderiam levar a uma penetração do corante nos tecidos saudáveis, o que resultaria em danos aos tecidos sadios do paciente.

Em 2001, Usacheva e colaboradores³⁴ estudaram os principais fotossensibilizadores do grupo das fenotiazinas, AM e AT, quanto à sua ação bactericida na presença e na ausência de luz em bactérias Gram+ e Gram-. Utilizando-se de suspensão em solução salina de *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, e *P. aeruginosa*, os autores avaliaram os efeitos da concentração dos corantes, o tempo de incubação na ausência de luz, a dose de irradiação e a intensidade da fonte de luz para a morte destas espécies. Os autores concluíram que o AT foi mais efetivo, tanto na presença quanto na ausência de luz, entretanto, o AM mostrou redução bacteriana significativa em todos os microrganismos estudados.

Hamblin e colaboradores³⁵, em 2002, avaliaram o efeito do tamanho da cadeia de polilisina conjugada ao fotossensibilizador clorina (e6) na fotodestruição de bactérias Gram+ e Gram-. Foi preparada uma solução fotossensibilizadora de clorina (e6) livre e conjugados de uma molécula de clorina (e6) ligada a oito lisinas ou a 37 lisinas. Estes conjugados foram

incubados à suspensão de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente uma bactéria Gram+ e uma Gram-, e irradiados com um laser de diodo de $\lambda = 660\text{nm}$ com densidades de energia de 10 a 40 J/cm². Os FS conjugados se aderiram mais facilmente aos microrganismos, enquanto a clorina livre apenas se ligou à bactéria Gram+. Os resultados mostraram que a clorina (e6) ligada à cadeia de 37 lisinas foi efetiva na redução de *E.coli*. O *S. aureus*, por outro lado, foi morto pela clorina livre e pelos dois conjugados, sendo o FS de menor cadeia de lisinas mais eficiente para esta bactéria. Os autores sugeriram que a maior cadeia de lisinas ligada à clorina (e6) é necessária para que este FS penetre através da membrana externa das bactérias Gram-, sendo as bactérias Gram+ mais permeáveis à menor cadeia de lisina. Entretanto, como os dois microrganismos podem ser eficientemente reduzidos pelo FS ligado à cadeia de 37 lisinas, os autores indicam este FS de cadeia maior para uso em PDT antimicrobiana.

Teichert e co-autores³⁶, em 2002, estudaram o efeito fotodinâmico do AM para o tratamento de candidíase oral induzida em camundongos imunodeprimidos. Os autores utilizaram concentrações de 250 a 500 µg/mL do AM, com um tempo de pré-irradiação de 10 minutos para a morte do fungo *C. albicans*. Os resultados mostraram que a morte do fungo foi dependente da concentração do fotossensibilizador. As concentrações de 450 e 500 µg/mL foram as que apresentaram as maiores reduções fúngicas, obtendo uma redução de aproximadamente 3 log do microrganismo e eliminando totalmente o mesmo da área tratada. Baseados nestes resultados, os autores indicaram a PDT antimicrobiana para o tratamento da candidíase oral em pacientes imunossuprimidos.

Usacheva e colaboradores³⁷, em 2003, avaliaram por espectroscopia, as interações sofridas pelos corantes AM e AT na presença de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *H. influenzae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os dados obtidos mostraram uma reação metacromática dos corantes e que, na presença das bactérias, os FS tendem à formação de dímeros. Esta tendência foi maior para o AT do que para o AM. Os autores relataram também que a dimerização do FS foi maior na presença de bactérias Gram-.

Em 2004, Hamblin e Hassan³, revisando a literatura, sugeriram o uso da PDT em infecções localizadas. Os autores mostraram a atuação desta terapia em microrganismos Gram+ e Gram -. Em geral, a maior susceptibilidade das bactérias Gram+ é explicada por sua fisiologia, pois sua membrana citoplasmática é composta de peptideoglicanos relativamente porosos que permitem que o FS penetre. Por outro lado, os Gram- possuem, além da membrana citoplasmática, uma membrana externa. Esta membrana forma uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente protegendo estas bactérias da ação da PDT. Os autores imaginam que no futuro, com o aumento do número de pacientes imunossuprimidos, devido aos transplantes, câncer ou AIDS, terapias alternativas ao uso de antibióticos será uma tendência.

O'Riordan e colaboradores³⁸, em 2005, revisando a literatura, mostraram que uma variedade de FS, de diferentes grupos, incluindo porfirinas, derivados de clorofila, ftalocianinas, entre outros, são eficientes na redução bacteriana, tanto em bactérias Gram+ quanto Gram- e também eficientes contra fungos e vírus. Muitos dos efeitos relatados na literatura sobre a eficiência da PDT são ainda baseados em trabalhos *in vitro*. Apenas um número limitado de artigos

utilizou modelos de estudo em animais ou estudos clínicos e estes estudos reportam moderado índice de sucesso, que não condiz com a expectativa criada após os estudos *in vitro*. Os autores consideram que mais estudos ainda são necessários para que se entendam os mecanismos da PDT na redução microbiana

Jori³⁹, em 2006, relata que a PDT há muito tempo tem se mostrado uma eficiente alternativa aos atuais tratamentos com antibióticos e antimicrobianos, pois estes têm falhado no combate às cepas resistentes de microrganismos. O autor citou que os fatores favoráveis ao uso da PDT são: amplo espectro de ação da PDT contra diferentes microrganismos; os FS normalmente não apresentam toxicidade na ausência de luz; nas doses utilizadas, a morte microbiana se dá principalmente como consequência de danos à membrana do microrganismo, o que minimiza os riscos de processos mutagênicos e aparecimento de cepas resistentes; a PDT age de maneira igual sobre microrganismos naturais e cepas resistentes dos mesmos e uma combinação da terapia convencional e PDT é perfeitamente possível.

Em 2006, Tegos e co-autores⁴⁰ estudaram uma segunda geração do conjugado entre clorina (e6) e polietilenimina em três diferentes formas moleculares: um conjugado em pequena cadeia linear, um conjugado em pequena cadeia de ligação cruzada e um conjugado de grande cadeia de ligação cruzada. Os FS foram avaliados por cromatografia líquida de alta performance e por sua eficiência em matar diferentes microrganismos: bactérias Gram+ (*S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*), bactérias Gram- (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e o fungo *C. albicans*. Após exposição à luz em baixa intensidade, as moléculas maiores de ligações cruzadas reduziram

eficientemente todos os microrganismos, enquanto as moléculas lineares não mataram as bactérias Gram-. Em relação aos conjugados de primeira geração compostos por polilisinas, os conjugados de polietilenimina foram mais resistentes à degradação por proteases como a tripsina. Estes resultados, segundo os autores, sugerem que a segunda geração de conjugados é superior aos conjugados à base de polilisina para PDT antimicrobiana. Nesse trabalho, os autores se basearam no trabalho de Kralic and Mohsni⁴¹ que, em 1978, descreveram um novo método para detecção de oxigênio singlete em solução aquosa. De forma sucinta, este método detecta a produção desta espécie reativa de oxigênio, através da análise da atenuação da densidade óptica da solução em $\lambda = 440$ nm, como consequência da degradação do N,N dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) na presença de L-histidina, utilizando um espectrofotômetro. Para a detecção indireta da reação fotodinâmica do tipo I com a formação de radicais livres do tipo superóxido, os autores utilizaram o método proposto por Yamakoshi e colaboradores em 2003⁴², detectando o superóxido através da análise do aumento da densidade óptica da solução contendo o fotossensibilizador em $\lambda = 580$ nm, como consequência da oxidação da solução de cloreto azul de nitrotetrazólio (NBT) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), avaliando-se por espectroscopia de absorção.

Jori e colaboradores⁴³, em 2006, em um trabalho de revisão, concluíram que a PDT pode ser uma eficiente modalidade alternativa de tratamento para infecções microbianas localizadas, através da aplicação local de um FS, seguido por irradiação da área infectada. Possíveis campos clínicos para utilização desta terapia incluem o tratamento de úlceras crônicas, queimaduras infectadas, acne e uma variedade de infecções orais. Estes autores relataram,

ainda, que um FS ideal deve possuir as seguintes características: ser positivamente carregado quando em pH fisiológico e possuir moderada lipofilicidade. Este tipo de FS pode, em baixas concentrações, reduzir de 4 a 5 logs de uma população microbiana após incubação e irradiação por curtos períodos de tempo.

3.2 – Associação PDT e Peróxidos

Garcez e colaboradores⁴⁴, em 2002, utilizaram pela primeira vez, um fotossensibilizador associado a uma pasta a base de peróxido de uréia em cultura de *E. faecalis*. Os autores mostraram que a associação do fotossensibilizador azuleno com a pasta a base de peróxido resultou em maior redução bacteriana do que a observada quando da utilização do fotossensibilizador em solução aquosa. A análise por espectroscopia de absorção mostrou que a associação do azuleno com o peróxido não resultou em alterações significativas nas características do fotossensibilizador e aumentou sua eficiência na redução microbiana de *E. faecalis*.

Hayek e colaboradores⁴⁵, em 2005, baseados no trabalho de Garcez, utilizaram a mesma pasta a base de peróxido e azuleno em peri-implantite provocada em cães. Em um período de 4 meses, a doença foi induzida em dezoito implantes previamente colocados na região dos primeiros pré-molares de cães labradores. Após a indução da inflamação peri-implantar, as amostras foram divididas em dois grupos. Um dos grupos foi submetido à curetagem cirúrgica por retalho muco-periosteal. O outro grupo foi tratado por curetagem convencional com ultra-som e terapia fotodinâmica, utilizando a pasta e um

laser de diodo de 50 mW, emitindo em $\lambda = 685$ nm. As coletas microbiológicas mostraram que a terapia fotodinâmica, assim como o tratamento cirúrgico, obteve significativa redução microbiana para os seguintes microrganismos: *Prevotella sp*, *Fusobacterium sp* e *Streptococcus beta-haemolyticus*. Os autores concluíram que a PDT pode ser uma interessante terapia para a redução microbiana em peri-implantites, podendo ser uma alternativa ao tratamento cirúrgico.

Garcez e colaboradores⁴⁶, em 2006, investigaram a ação do FS azuleno associado a uma pasta de peróxido de uréia para a redução bacteriana em canais radiculares de dentes anteriores extraídos. Trinta canais radiculares de dentes anteriores extraídos foram contaminados com uma suspensão de *E. faecalis* por 24 h. O grupo controle (n=10) não recebeu nenhum tratamento. O grupo tratamento convencional recebeu uma solução de NaOCl a 0,5% por 30 min e o grupo PDT recebeu a pasta de peróxido de uréia associada ao azuleno por 5 min, sendo irradiado com um laser de diodo ($\lambda = 685$ nm) com uma energia de 1,8 J por 3 min. A coleta microbiológica mostrou que a pasta fotossensibilizadora na ausência de radiação, ou a irradiação laser na ausência da pasta fotossensibilizadora, não promoveu nenhum efeito antimicrobiano. A solução de NaOCl por 30 min obteve redução de 93,25% e a PDT antimicrobiana reduziu 99,2% das bactérias no interior dos canais. Os autores concluíram que a PDT pode ser um interessante tratamento complementar à terapia endodôntica convencional.

McCullagh e Robertson⁴⁷ investigaram os efeitos fotodinâmicos do AM na presença de H_2O_2 para a morte da cianobactéria *Synechococcus leopoliensis*. Os autores avaliaram a eficiência fotodinâmica através da

deterioração da fluorescência do pigmento ficocianina, um pigmento responsável pela fotossíntese em cianobactérias, relacionando a destruição deste pigmento com a morte bacteriana. A toxicidade do composto AM/H₂O₂ foi também avaliada e foi encontrada apenas uma morte bacteriana de 5% após 250 min, mostrando a baixa toxicidade da solução na ausência de luz. Após irradiação com luz halógena, a redução bacteriana foi de 80%. Os autores concluíram que a irradiação do *S. leopoliensis* na presença de uma solução de AM e H₂O₂ resulta em morte bacteriana e na degradação do fotossensibilizador. Em uma atmosfera livre de O₂, foi verificado um aumento na ação do composto AM/ H₂O₂. Baseados nesses achados, eles propõem que o processo envolve um mecanismo fotodinâmico do tipo I, onde um elétron é transferido do AM para o H₂O₂, gerando espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila e, mais provavelmente, radicais hidroperoxila. Os autores se basearam no trabalho de Gak e colaboradores de 1998⁴⁸, que sugere três possíveis caminhos para esta reação: transferência de elétrons do FS excitado para o H₂O₂ com a formação de um radical cátion do FS e OH[•], transferência de elétrons do H₂O₂ para a molécula do FS com a formação de um radical ânion do FS e HO₂[•] ou supressão do estado tripleto excitado pelo H₂O₂ sem a formação de nenhum subproduto. Os autores sugeriram ainda que a PDT antimicrobiana pode ter indicações para a destruição de biofilme formado por algas e cianobactérias em superfícies de pedra de edifícios e estátuas.

Em 2006, McCullagh e Robertson⁴⁹ relataram o efeito fotodinâmico do AM na presença de H₂O₂ quando irradiado com luz visível, para a destruição da alga *Chlorella vulgaris*. Para determinar os mecanismos envolvidos neste processo, os experimentos foram realizados em condições de aerobiose e de

anaerobiose. Os autores utilizaram o AM a $6\mu\text{M}$, associado ao H_2O_2 a 1M , sob irradiação com uma lâmpada halógena de tungstênio de 500mW por 240 min . Os resultados mostraram que na ausência de luz, a adição de H_2O_2 não produziu alterações significativas ao fotossensibilizador no período do experimento. Sob irradiação, a presença do H_2O_2 associado ao fotossensibilizador, aumentou a destruição da alga em aproximadamente 40% , comparada à destruição deste organismo pelo FS sozinho. Quanto aos mecanismos envolvidos no processo fotodinâmico, McCullagh e Robertson sugeriram que em uma atmosfera aeróbica, há um predomínio da reação tipo II e que a presença de H_2O_2 produziu um aumento no tempo de vida do oxigênio singleto, levando a uma maior morte do microrganismo, ao mesmo tempo em que o oxigênio singleto atacaria o H_2O_2 produzindo radicais OH^* , aumentando ainda mais a eficiência da PDT. Na atmosfera inerte livre de oxigênio, os autores não notaram diferenças significantes na morte da alga. Os resultados obtidos em atmosfera com O_2 foram mantidos quando o oxigênio não estava presente. Segundo os autores, uma possível explicação para este fato é a ocorrência de reação tipo I e tipo II levando, portanto, a um aumento na morte do microrganismo.

3.3 – Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio

A detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um desafio constante à pesquisa científica, pois requer o uso de ferramentas e métodos sensíveis e específicos para a investigação a fundo dos mecanismos envolvidos em processos biológicos. As ERO apresentam algumas

características que as tornam difíceis de detectar, como seu curto tempo de vida e a variedade de antioxidantes e defesas naturais existentes *in vivo* capazes de reagir com estas espécies. Sondas fluorescentes são excelentes sensores para ERO, devido à sua alta sensibilidade, simplicidade de utilização e coleta de dados e resolução espacial para técnicas de microscopia de imagens. Os métodos de detecção utilizados atualmente são a Ressonância Spin Eletrônica (ESR), espectrofotometria, luminescência e fluorescência, sendo que os métodos diretos são mais precisos do que os métodos citados, já que possuem pouca estabilidade. As sondas ou seus produtos podem ser modificados pelo metabolismo celular e há pouca especificidade frente a agente redutores ou oxidantes. Entretanto, estes métodos são importantes ferramentas para identificação e quantificação de ERO. Diversos são os trabalhos na literatura, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando a detecção tanto indireta como direta de ERO.

LeBel e colaboradores⁵⁰, em 1992 descreveram um método para detecção indireta de ERO em solução aquosa utilizando o composto diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA, na presença de ERO é convertido em diclorofluoresceína (DCF), uma molécula altamente fluorescente e facilmente detectável. Os autores detectaram a formação de radicais livres durante a clássica reação de Fenton, onde um íon metálico, neste caso o Fe^{++} é adicionado a uma solução de H_2O_2 . Os autores alertam que como a reação de oxidação da DCFH e formação da DCF é mediada por diversas reações intermediárias, este método deve ser utilizado com cuidado. Entretanto, eles concluíram que este é um atrativo método de detecção de ERO.

Bourré e co-autores⁵¹ avaliaram em tecidos biopsiados a formação de ERO utilizando como sonda fluorescente o composto DCFH-DA. A detecção de radicais livres pelos compostos DCFH-DA/DCF foi primeiramente descrita por Keston e Brant em 1965⁵² e é baseado em dois passos: ativação do DCFH-DA por NaOH, produzindo DCFH, e oxidação deste composto para a formação de DCF. Os autores concluíram que este é um fácil, rápido e, principalmente, um método confiável para a detecção de ERO podendo ser um indicador da eficiência da PDT em tecidos biopsiados.

Wan e co-autores⁵³ avaliaram através da fluorescência do DCF, o *stress* oxidativo produzido em culturas de células epiteliais por diferentes doses de radiação gama. Os autores concluíram que o DCFH é uma sonda capaz de detectar o *stress* oxidativo produzido por pequenas doses de radiação e que o aumento da fluorescência da DCF é diretamente proporcional ao aumento da dose de radiação a que as células foram expostas.

Gomes e colaboradores⁵⁴, em 2005, revisaram a literatura sobre as sondas fluorescentes utilizadas para detecção de ERO. Os autores relatam a utilização de compostos de fluoresceína para a detecção do radical hidroxila tanto em meios biológicos como em meios não biológicos.

Bartosz⁵⁵ revisou a literatura quanto ao uso de sondas espectroscópicas para a detecção de ERO. Dentre as diversas sondas citadas, pode-se destacar o uso do cloreto azul de nitrotetrazólio (NBT) para a detecção do radical superóxido e do composto DCFH-DA para a detecção de radicais livres, dentre eles, os grupos hidroxila, peroxinitrito, radicais peroxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singleto.

Maisch e colaboradores⁵⁶, em 2007, estudaram os processos oxidativos que ocorrem durante a morte bacteriana por PDT. Os autores detectaram diretamente, no interior da bactéria, a formação de oxigênio singlete através da sua luminescência em $\lambda = 1270\text{nm}$. A formação do $^1\text{O}_2$ foi avaliada em diferentes concentrações do fotossensibilizador, após diferentes tempos de pré-irradiação e na presença de concentrações crescentes de bactérias. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de células levou a uma maior deterioração do sinal emitido pelo $^1\text{O}_2$. Os autores sugeriram que em concentrações baixas de bactérias por mililitro de solução, as ERO têm um tempo maior para sua difusão no interior das células e que este método mostrou a importância do suprimento de oxigênio para a eficiência da PDT antimicrobiana.

Koristov e colaboradores⁵⁷, em 2007, detectaram a quantidade de ERO no interior de duas linhagens de células tumorais humanas na presença de soro sanguíneo, através da oxidação da DCFH. Os autores determinaram a quantidade de ERO no interior das células e no meio utilizando medidas obtidas em um fluorímetro.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - FOTOSSENSIBILIZADORES

- Foram empregadas soluções do corante fenotiazínico azul de metileno (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA) sem purificação adicional em todos os ensaios efetuados, e um conjugado à base de clorina (gentilmente cedido pelo Prof. Michael R. Hamblin, Dep. de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Harvard EUA). Os Fs foram testados em diferentes concentrações, em solução com água destilada e em associação com solução de H₂O₂.

4.2 - FONTE DE LUZ

Os experimentos foram realizados empregando-se três diferentes fontes de luz:

Uma fonte de luz de amplo espectro, não coerente associada a um sistema de fibras intercambiáveis e a um filtro óptico, possibilitando a emissão de radiação em 630nm $\pm$ 30 nm e potência de 800 mW com a utilização da fibra (LumaCare LC 122M, Londres – Reino Unido).

Um laser de diodo de arseneto de gálio e alumínio de 50 mW de potência emitindo em 664 nm e em modo contínuo (Morgotron, São Carlos, Brasil)

Também foi utilizado um LED (*light-emitting diode* ou diodo emissor de Luz), com potência total de saída de 250mW. O pico da emissão deste equipamento é em 640nm, com uma banda de $\pm$ 30nm (Protótipo LED 630, MMOptics, São Carlos, Brasil).

4.3 - ANÁLISE DA PRESENÇA DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO DISPONÍVEL NA SOLUÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR

Os solventes empregados, água destilada e peróxido de hidrogênio, foram acondicionados em um béquer na quantidade de 100mL, e foi realizada a medição de oxigênio dissolvido com medidor portátil de oxigênio dissolvido (Hanna Instruments, Londres, Reino Unido). As medidas foram feitas sob agitação magnética (150rpm) em temperatura ambiente. A sonda calibrada do medidor, com ajuste de altitude e salinidade, foi introduzida no béquer por 30s, para se obter uma leitura estável e os valores obtidos em ppm foram registrados. O experimento foi realizado no IPEN-CNEN/SP.

4.4 - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA ADIÇÃO DE H₂O₂ NA REDUÇÃO MIROBIANA POR TERAPIA FOTODINÂMICA

4.4.1 - REDUÇÃO BACTERIANA *IN VITRO*

Culturas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 27659), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 19660) e do fungo *Candida albicans* (51393) foram crescidas em BHI (*brain heart infusion*) a 37°C (em estufa) por 24 horas até que formassem uma cultura microbiana em fase de crescimento estacionário de aproximadamente 10⁹ microrganismos/mL. As culturas foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffer saline* - PBS). Um e meio mL da solução contendo um dos microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) foi dividida em sete grupos e

colocada em uma placa de 96 poços. Os grupos 1, 2 e 3 receberam, respectivamente, por 30 minutos: nenhum tratamento, 60 μM de AM e 1 M de H_2O_2 na ausência de luz.

Os grupos 4, 5, 6 e 7 receberam respectivamente: 60 μM de AM, 60 μM de AM associado a 10 mM de H_2O_2 , 60 μM de AM associado a 100 mM de H_2O_2 e 60 μM de AM associado a 1M de H_2O_2 . Os grupos 4, 5, 6 e 7, após os 10 minutos de pré-irradiação, receberam 40 J/cm^2 de irradiação.

Todas as irradiações foram realizadas com a lâmpada halógena e foram executadas de forma que o espalhamento de luz em cada um dos poços irradiados na placa não interferisse com o grupo seguinte do experimento. Após o experimento 100 μL de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços, submetidos à diluição seriada em PBS até a diluição de 10^{-6} e incubados em placas de Petri com ágar BHI por 24 horas em estufa a 37°C para contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) de acordo com a metodologia proposta por Jeff *et al*⁵⁸. Este método foi utilizado em cada um dos microrganismos citados e os experimentos realizados em triplicata.

O mesmo experimento, com os mesmos parâmetros e seguindo a mesma metodologia foi utilizada com o FS conjugado a base de clorina. Também estes experimentos foram realizados em triplicata. Os experimentos foram realizados no Wellman Center for Photomedicine - Harvard Medical School.

4.5 - ANÁLISE DOS MECANISMOS FOTOFÍSICOS E FOTOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA PDT EM PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.5.1 - DETECÇÃO INDIRETA DE ERO PELA DEGRADAÇÃO DO RNO

Para a detecção de oxigênio singlete as seguintes substâncias químicas foram utilizadas em uma cubeta de quartzo com volume total de 3mL e com 1 cm de caminho óptico: N,N dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e L-histidina (Aldrich, Milwaukee, EUA) utilizadas sem purificações adicionais.

Na cubeta foram adicionados 15 mM do L-histidine, 5µM do FS e água destilada q.s.p. Uma medida inicial da absorção foi realizada para comparação. Foi então adicionado à cubeta, 13,3 µM do RNO e uma nova medida da absorção foi realizada, analisando-se a absorção no comprimento de onda de 440 nm. A amostra foi irradiada em intervalos de 1 minuto com fonte halógena. Para garantir uma irradiação uniforme, visto que, a fonte de luz não irradiava toda a superfície da cubeta, um agitador magnético foi inserido no interior da mesma, mantendo o líquido no interior da amostra em constante movimentação, durante todo o tempo de irradiação.

A avaliação da produção de oxigênio singlete pelo AM e pelo conjugado a base de clorina sob irradiação por fonte de luz branca de 500 mW , foi realizada através da análise da atenuação da densidade óptica em 440nm, como consequência da degradação da solução de RNO na presença de L-histidina, utilizando-se um espectrofotômetro (8453 UV-Visible System, Agilent Technologies. Palo Alto, CA, EUA). O mesmo método foi repetido substituindo-se 1mL da solução aquosa por 1mL de H₂O₂ a 1M.

A detecção indireta de oxigênio singleto foi realizada utilizando-se os FS AM e o conjugado a base de clorina, em água destilada e em solução de H_2O_2 . Os experimentos foram realizados no Wellman Center for Photomedicine - Harvard Medical School.

4.5.2 - DETECÇÃO DIRETA DE OXIGÊNIO SINGLETO POR FOSFORESCÊNCIA EM $\lambda=1270$ nm

A análise da produção de oxigênio singleto foi realizada em solução dos FS a 30 μM preparada em D_2O e em solução dos FS (30 μM) associados ao H_2O_2 a 1M preparada também em D_2O .

Os espectros de absorção das soluções foram obtidos em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm em espectrômetro interfaceado com computador (Multispec-1501, Shimadzu, Japão).

As varreduras foram efetuadas de $\lambda=280\text{nm}$ a $\lambda=800\text{nm}$. Espectros de fluorescência foram obtidos em cubetas de quartzo com 1cm de caminho óptico em fluorímetro (Spex 1681, Fluorolog, EUA) com excitação em $\lambda=532\text{nm}$ e registros obtidos de $\lambda=600\text{nm}$ a $\lambda=800\text{nm}$.

Através da análise dos espectros de absorção e fluorescência, foi feita a correção da concentração de FS.

A emissão no infravermelho do oxigênio singleto foi obtida após excitação da amostra com laser de Nd:YAG (Surelite III, Continuum, Santa Clara, EUA) operando em $\lambda=532\text{nm}$ com energia de pulso de 30mJ e com largura de pulso de 10ns, excitando a amostra em um fluorímetro (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido) conectado a uma

fotomultiplicadora para infravermelho (R5509 Hamamatsu Co., Bridgewater, EUA).

O comprimento de onda de emissão foi selecionado utilizando-se filtro de sílica e monocromador. A emissão do oxigênio singleto transiente foi obtida através do acúmulo do sinal obtido após 20 pulsos de irradiação. Os resultados foram analisados utilizando-se um *software* apropriado. O experimento foi realizado no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces IQ/USP.

4.5.3 - DETECÇÃO INDIRETA DE SUPERÓXIDO ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO DO NBT

Para a detecção do ânion superóxido (O_2^-), as seguintes substâncias químicas foram utilizadas em uma cubeta de quartzo com volume total de 3mL e com 1 cm de caminho óptico: cloreto azul de nitrotetrazolium (NBT) e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) (Aldrich, Milwaukee, EUA) utilizadas sem purificações adicionais.

Na cubeta foram adicionados 80 μ M da NADH, 10 mM de NBT e água destilada q.s.p. Uma medida inicial da absorção foi realizada para comparação.

Foi então adicionado à cubeta, 10 μ M do FS e uma nova medida da absorção foi realizada, analisando-se a absorção no comprimento de onda de 580nm. A amostra foi irradiada em intervalos de 1 minuto e analisada como descrito anteriormente. Para garantir uma irradiação uniforme, visto que a fonte de luz não irradiava toda a superfície da cubeta, um agitador magnético foi inserido no interior da mesma, mantendo o líquido no interior da amostra em constante movimentação, durante todo o tempo de irradiação.

A avaliação da produção de superóxido pelo AM e pelo conjugado a base de clorina sob irradiação por fonte de luz branca de 500mW, foi realizada

através da análise do aumento da densidade óptica em 580nm, como consequência da oxidação da solução de NBT na presença de NADH, utilizando-se um espectrofotômetro (8453 UV-Visible System, Agilent Technologies. Palo Alto, CA, EUA). O mesmo método foi repetido substituindo-se 1mL da solução aquosa por 1mL de H_2O_2 a 1M.

Também neste experimento, a detecção de superóxido foi realizada utilizando-se os FS AM e o conjugado a base de clorina, em água destilada e em solução de H_2O_2 . Os experimentos foram realizados no Wellman Center for Photomedicine - Harvard Medical School.

4.5.4 - DETECÇÃO INDIRETA DE ERO PELA OXIDAÇÃO DO DCFH

Para a detecção de ERO, as seguintes substâncias químicas foram utilizadas em uma cubeta de quartzo com volume total de 3mL e caminho óptico de 1 cm: diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), ácido sulfúrico e hidróxido de sódio (Aldrich, Milwaukee, EUA) utilizadas sem purificações adicionais.

Na cubeta foram adicionados 20 μL da DCFH-DA (100 nM) e 10 μL de ácido sulfúrico por 20 minutos para a remoção do radical diacetato. Após os 20 minutos foi adicionado 10 μL de hidróxido de sódio para a neutralização do ácido.

Para a tomada das medidas de formação dos radicais livres foi acrescido à diclorofluoresceína previamente preparada, o FS e água destilada.

A amostra foi irradiada com um laser de diodo de 50 mW, emitindo no comprimento de onda de 664nm por 10 segundos.

A formação dos ERO foi mensurada pela fluorescência da DCF em 520nm após excitação da amostra em 490nm. De modo sucinto, o aparecimento da fluorescência é explicado pela oxidação do composto DCFH pelas espécies reativas de oxigênio e formação da molécula altamente fluorescente DCF.

O mesmo método foi repetido substituindo-se 600 μL da solução aquosa por 1 μL de peróxido de hidrogênio a 1M.

Também neste experimento, a detecção ERO foi realizada utilizando-se os FS Azul de metileno e o conjugado a base de clorina, em água destilada e em solução de H_2O_2 . O experimento foi realizado no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces IQ/USP.

4.5.5 - DETECÇÃO INDIRETA DE ERO PELA OXIDAÇÃO DO DCFH NO INTERIOR DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Uma suspensão do microrganismo *C. albicans* foi previamente incubada em solução contendo AM a 60 μM por 10 min. Após a remoção do fotossensibilizador por centrifugação a 3000rpm por 6 minutos as células foram incubadas em uma solução de 10 μM de diacetado de diclorofluoresceína (DCFH-DA) por 15 minutos e novamente centrifugadas como descrito anteriormente para a remoção do DCFH-DA não absorvido pelo microrganismo.

As células foram, então, irradiadas em intervalos de 1 minuto, por um laser de diodo com 40 mW ($\lambda=664\text{nm}$) em doses sucessivas de 4,8 J/cm^2 e avaliadas por microscopia de fluorescência. Foi realizada a captação de uma

imagem a cada minuto para a detecção da formação de espécies reativas de oxigênio no interior do microrganismo. As imagens das células foram obtidas utilizando-se um microscópio de fluorescência, onde uma alíquota de 100 μ L da solução, disposta em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula do mesmo material, foi excitada em 500nm. A fluorescência do DCF foi captada utilizando-se um filtro de corte de $\lambda < 500$ nm, em função do tempo de irradiação. As células foram irradiadas em duas condições distintas: na presença ou ausência de H_2O_2 .

As imagens obtidas foram analisadas pelo software image J (National Institute of Health, USA) e Adobe Photoshop CS3 versão para Machintosh (Adobe, USA). Em cada imagem foram selecionadas 20 células, sendo que, estes conjuntos de células foram avaliados quanto a intensidade de fluorescência através da análise de seu histograma. Os dados resultantes foram analisados graficamente em função do tempo de irradiação. O experimento foi realizado no Laboratório de Cristalografia, IFUSP.

4.6 - ANÁLISE DOS MECANISMOS FOTOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA PDT EM PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.6.1 - CAPTAÇÃO DO FS PELA BACTÉRIA SOB AÇÃO DE H₂O₂

Culturas de *E. coli* (HB101) na concentração de 10⁹ bactérias por mL foram centrifugadas e suspensas em solução PBS.

Amostras da bactéria em PBS foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos:

Grupo FS : 1 mL da suspensão bacteriana recebeu 1 mL do FS a 60 µM por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e analisado por espectroscopia de absorção óptica para quantificação do FS não absorvido pela bactéria, através da análise da concentração do mesmo na solução.

Grupo FS+H₂O₂: 1 mL da suspensão bacteriana recebeu uma associação do FS a 60 µM em 1 mL de H₂O₂ a 1 M por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos e o sobrenadante foi removido para quantificação do FS não absorvido pela bactéria.

Grupo H₂O₂+FS: 1 mL da suspensão bacteriana recebeu 1 mL de H₂O₂ a 1 M por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos e o peróxido foi removido. As bactérias foram , então ressuspensas em PBS e foi adicionado 60 µM de FS por outros 10 minutos. A solução foi novamente centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos e o sobrenadante foi removido para quantificação do FS não absorvido pela bactéria.

O experimento foi realizado com o fotossensibilizador AM e a análise foi realizada através da comparação dos espectros de absorção entre os respectivos grupos, nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP.

O mesmo experimento foi realizado com o conjugado de clorina, entretanto, utilizando-se uma cultura de *C. albicans* ao invés de *E. Coli* e a análise da captação do FS pelo microrganismo foi realizada por microscopia de fluorescência. As análises das imagens foram realizadas como descrito no item 4.5.5 para análise da formação de ERO, isto é, pela intensidade da fluorescência do FS no interior das células. Este experimento foi realizado no Laboratório cristalografia IFUSP.

4.6.2 - MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA MORTE BACTERIANA EM PRESENÇA DE PERÓXIDO

Diferentes seqüências da associação do peróxido com o FS foram testadas em cultura de *E. coli* (HB101).

Culturas da bactéria foram crescidas em BHI (brain heart infusion) a 37°C (em estufa) por 24 horas até que atingissem a fase de crescimento estacionário de aproximadamente 10^9 microrganismos/mL. As culturas foram centrifugadas a 2.000rpm por 10 minutos e ressuspensas em PBS. Foram, então selecionados 3 grupos experimentais:

Grupo 1: 100 µL da solução contendo a bactéria foi colocada em uma placa de 96 poços e recebeu por 10 minutos 60 µM de FS associado a 1M de H₂O₂. A amostra recebeu após o período de pré-irradiação, 40 J/cm² de irradiação com o LED.

Grupo 2: 100 μL da solução contendo a bactéria foi colocada em placa de 96 poços e recebeu por 10 minutos 1M de H_2O_2 . Após os 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos e o peróxido foi removido. As bactérias foram, então, ressuspensas em PBS e foi adicionado 60 μM de FS por outros 10 minutos. A amostra recebeu após o período de pré-irradiação, 40 J/cm^2 de irradiação com o LED.

Grupo 3: 100 μL da solução contendo a bactéria foi colocada em uma placa de 96 poços e recebeu por 10 minutos 60 μM do FS. Após os 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 2000 rpms por 10 minutos e o FS foi removido. As bactérias foram, então, ressuspensas em PBS e receberam 40 J/cm^2 de irradiação com o LED. Após a irradiação, foi adicionado à suspensão 1M de H_2O_2 por outros 10 minutos.

Todas as irradiações foram realizadas de forma que o espalhamento de luz em cada um dos poços irradiados não interferisse com o grupo seguinte do experimento. Após o experimento 100 μL de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços, submetidos à diluição seriada em PBS até a diluição de 10^{-6} e incubados em placas de petri com ágar BHI por 24h para contagem de ufc. Os experimentos foram realizados em triplicata, nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP.

4.6.2.1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados resultantes destes experimentos foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student* utilizando-se o *software* Microsoft Excel (Microsoft, EUA).

5 - RESULTADOS

5.1 - ANÁLISE DA PRESENÇA DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO DISPONÍVEL NA SOLUÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR

A análise dos solventes utilizados revelou que há uma diferença na disponibilidade de O_2 entre a água deionizada e H_2O_2 . Os valores obtidos estão descritos na tabela abaixo:

SOLVENTE	OXIGÊNIO DISSOLVIDO (ppm)
Água destilada	7,48
Peróxido de hidrogênio	9,74

Tabela 1 – Média da quantidade de O_2 dissolvido nos solventes analisados. Observa-se que na presença de H_2O_2 há um aumento aproximado de 20% na disponibilidade de O_2 .

5.2 - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA ADIÇÃO DE H₂O₂ NA REDUÇÃO MICROBIANA POR TERAPIA FOTODINÂMICA

5.2.1-Redução Microbiana *in vitro* – Toxicidade no escuro.

Todos os microrganismos testados, sofreram redução quando em contato com o FS (60 μ M) ou com o H₂O₂ (1 M) sem a ativação dos mesmo com luz, mostrando que estes compostos apresentam certa toxicidade. Os gráficos 1 e 2 assim como as tabelas 2 e 3, mostram a redução microbiana obtida para cada um dos FS e pelo peróxido de hidrogênio sobre os microrganismos testados.

Gráfico 1: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca de cada fotossensibilizador em bactérias Gram+ (*S. aureus*), Gram- (*P. aeruginosa*) e fungos (*C. albicans*).

	Redução AM	Desvio padrão	Redução H ₂ O ₂	Desvio padrão
<i>S. aureus</i>	19,5	1,07	26,6	4,5
<i>P. aeruginosa</i>	17	2,98	21,5	2
<i>C. albicans</i>	19,6	0,96	19,73	1,19

Tabela 2: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador

Gráfico 2: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador e do peróxido de hidrogênio em fotossensibilizador em bactérias Gram+ (*S. aureus*), Gram- (*P. aeruginosa*) e fungos (*C. albicans*).

	Redução Clorina	Desvio padrão	Reduç H ₂ O ₂	Desvio padrão
S. aureus	17,5	1,7	20	2,3
P. aeruginosa	15,5	1,86	16,3	2
C. albicans	18,6	1,96	17,73	1,17

Tabela 3: Média e desvio padrão da redução microbiana resultante da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador e do peróxido de hidrogênio.

5.2.2 - Redução Microbiana *in vitro*

Todos os microrganismos testados, em maior ou menor grau, perderam viabilidade celular após terem sido submetidos ao efeito fotodinâmico. Os gráficos 3, 4 e 5 mostram, respectivamente, a redução microbiana em bactérias Gram+, Gram- e fungos quando da utilização de AM e os gráficos 6, 7 e 8 a redução obtida com o conjugado a base de Clorina em solução aquosa ou em solução de peróxido, com diferentes concentrações de H₂O₂. Ambos os FS foram irradiados com a lâmpada LumaCare (LC 122M, Londres - Reino Unido), com uma dose de 40 J/cm². Os resultados mostram que o efeito fotodinâmico foi mais efetivo na presença de peróxido. Além disso, concentrações maiores de peróxido, produziu um aumento na redução microbiana.

Entretanto em nenhum dos microrganismos, mesmo quando o fotossensibilizador foi associado ao peróxido, foi alcançado 100% de redução, caracterizando estes parâmetros, portanto, como subletais.

Gráfico 3: Média e desvio padrão da redução microbiana de *S. aureus* (bactéria Gram+) resultante da toxicidade do AM em solução de H_2O_2 e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H_2O_2 .

	H ₂ O ₂ +AM	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	22,25	71,26	95,3	96,31	99,79
Desvio padrão	1,7	0,99	0,88	0,745	0,185

Tabela 4: Média e desvio padrão de redução microbiana de *S. aureus* resultante da toxicidade do AM em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

Gráfico 4: Média e desvio padrão da redução microbiana de *P. aeruginosa* (bactéria Gram-) resultante da toxicidade do AM em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

	H ₂ O ₂ +AM	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	20,5	62,59	89,95	94,13	98,64
Desvio padrão	2,98	1,49	0,95	1,34	0,665

Tabela 5: Média e desvio padrão da redução microbiana de *P. aeruginosa* resultante da toxicidade do AM em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

Gráfico 5: Média e desvio padrão da redução microbiana de *C. albicans* (fungo) resultante da toxicidade do AM em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

	H ₂ O ₂ +AM	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	21,6	73,7	86,9	94,36	98,92
Desvio padrão	2,79	2,21	1,06	1,72	0,823

Tabela 6: Média e desvio padrão da redução microbiana de *C.albicans* resultante da toxicidade do AM em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

Gráfico 6: Média e desvio padrão da redução microbiana de *S. aureus* (bactéria Gram+) resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

	H ₂ O ₂ +Clorina	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	19,97	75,3	96,5	98,01	99,995
Desvio padrão	2,5	1,1	0,4	0,65	0,32

Tabela 7: Média e desvio padrão da redução microbiana de *S. aureus* resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

Gráfico 7: Média e desvio padrão da redução microbiana de *P. aeruginosa* (bactéria Gram-) resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

	H ₂ O ₂ +Clorina	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	17,5	69,3	91,4	97,3	99,7
Desvio padrão	1,89	1,3	1,302	0,4	1,05

Tabela 8: Média e desvio padrão da redução microbiana de *P. aeruginosa* resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

Gráfico 8: Média e desvio padrão da redução microbiana de *C. albicans* (fungo) resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

	H ₂ O ₂ +Clorina	PDT	PDT + 10 mM	PDT + 100 mM	PDT + 1M
Redução (%)	17,6	65,327	92	97,3	99,69
Desvio padrão	1,79	0,86	1,45	1,2	0,322

Tabela 9: Média e desvio padrão da redução microbiana de *C.albicans* resultante da toxicidade do conjugado a base de clorina em solução de H₂O₂ e da PDT na ausência e na presença de três concentrações de H₂O₂.

5.3 - ANÁLISE DOS MECANISMOS FOTO-FÍSICOS E FOTO-QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA PDT NA PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

5.3.1 - Detecção indireta de Oxigênio singleto por degradação do RNO

Os gráficos 9 e 10 representam, respectivamente, a dinâmica de formação de oxigênio singleto, após a irradiação dos FS em solução aquosa ou em solução de peróxido, detectados indiretamente através da degradação do composto RNO na presença de L-histidina. A diminuição da absorção do RNO medida em 440nm indica a presença do oxigênio singleto, pois na presença desta ERO a L-histidina reage como oxigênio singleto formando uma substância intermediária que degrada o RNO levando a sua detecção evidenciada pela diminuição da intensidade em 440 nm.

É possível observar que para ambos os FS, a adição de H₂O₂ diminuiu a formação de ¹O₂, já que a curva representando o FS em solução de peróxido decai lentamente durante o tempo de irradiação.

Gráfico 9: Formação do oxigênio singlete após irradiação de solução de AM e AM associado ao H₂O₂.

Gráfico 10: Formação do oxigênio singlete após irradiação da solução contendo o conjugado a base de clorina e deste fotossensibilizador associado ao H₂O₂.

5.3.2 - Detecção direta do oxigênio singleto por fosforescência em $\lambda=1270$ nm

O gráfico 11 mostra a formação do oxigênio singleto pelo efeito fotodinâmico do conjugado a base de clorina quando excitados por um laser de Neodímio pulsado no segundo harmônico, emitindo em 532nm, detectados diretamente através da emissão fosforescente do oxigênio singleto em 1270nm. Observa-se que o sinal de fosforescência do conjugado a base de clorina na presença de peróxido tem sua intensidade diminuída em relação ao sinal do FS esta em solução aquosa, indicando uma diminuição na formação de do $^1\text{O}_2$.

Gráfico 11: Detecção de oxigênio singleto pelo efeito fotodinâmico do conjugado a base de clorina na presença e na ausência de H_2O_2 .

5.3.3 – Detecção de ERO por oxidação do NBT

Os Gráficos 12 e 13 representam, respectivamente, a dinâmica de formação de superóxido, pela irradiação do azul de metileno e do conjugado a base de clorina, detectados indiretamente através da oxidação do composto NBT na presença de NADH. A oxidação do NBT produz um aumento da densidade óptica deste composto em 580nm indicando a presença de espécies reativas de oxigênio, em especial o superóxido. Nota-se que a adição de H_2O_2 mantém quase constante a intensidade de absorção para ambos os FS.

Gráfico 12: Formação de superóxido pela irradiação do AM e deste fotossensibilizador associado ao H_2O_2 .

Gráfico 13: Formação de superóxido pela irradiação do conjugado a base de clorina e da associação deste fotossensibilizador ao H₂O₂.

5.3.4 – Detecção indireta de ERO por oxidação do DCFH

Os gráficos 14 e 15 mostram a dinâmica de formação de espécies reativas de oxigênio em solução aquosa e em solução de peróxido de hidrogênio. De forma sucinta, o composto DCFH na presença de ERO é convertido para DCF, um composto altamente fluorescente e facilmente detectável. Nota-se que a adição de peróxido diminui a intensidade de fluorescência para ambos os FS.

Gráfico 14: Formação de ERO pela irradiação do AM e deste fotossensibilizador associado ao H₂O₂.

Gráfico 15: Formação de ERO pela irradiação do conjugado a base de clorina e deste fotossensibilizador associado ao H₂O₂.

5.3.5 - Detecção indireta de ERO por oxidação do DCFH no interior de células eucarióticas

As figura 1 e 2 apresentam, respectivamente, a dinâmica de fluorescência do DCF no interior das células eucarióticas (*C. albicans*) em resposta a irradiação do azul de metileno em solução aquosa e na presença de H_2O_2 , com o laser de diodo de emissão vermelha. O gráfico 16 mostra a formação de ERO em solução aquosa e em solução de peróxido de hidrogênio.

Figura 1: Suspensão de *C. Albicans* carregadas com DCFH na presença de AM. Microscopia de fluorescência das células após irradiação. Nota-se o aumento da intensidade de fluorescência do DCF pela foto-oxidação do DCFH na presença do FS em função do tempo de irradiação.

Figura 2: Suspensão de *C. albicans* carregadas com DCFH na presença de AM em solução de peróxido de hidrogênio. Microscopia de fluorescência das células após irradiação. Nota-se o aumento da intensidade de fluorescência nos minutos iniciais de irradiação quando comparado a dinâmica de foto-oxidação do DCFH em presença do FS em solução aquosa.

Gráfico 16: Formação de ERO pela irradiação do AM e deste

fotossensibilizador associado ao H_2O_2 no interior do fungo *C. albicans*.

Observa-se que quando o AM se encontra em solução aquosa, a dinâmica de formação de ERO ocorre mais lentamente, tendo-se o pico de formação com 14 min de irradiação. Na presença de H_2O_2 , o pico de formação de ERO ocorre nos minutos iniciais de irradiação.

5.4-ANÁLISE DOS MECANISMOS BIOFÍSICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA PDT EM PRESENÇA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

5.4.1-Captação do FS ou microrganismos sob ação de H_2O_2

A análise da captação do AM pela *E. coli* após condicionamento prévio com peróxido de hidrogênio mostrou, que há uma maior captação de AM pela célula, observa-se no gráfico 17 que a concentração do AM diminui no sobrenadante após contato com H_2O_2 . A menor concentração do AM no

sobrenadante, independe do H_2O_2 ter sido usado como solvente ou ter condicionado previamente as células antes da incubação com o FS.

No Gráfico 18 nota-se, através da microscopia de fluorescência, que a concentração de clorina no interior da célula é maior quando o microrganismo é previamente condicionado com o peróxido ou quando o FS esta em solução com o H_2O_2 , quando comparado ao FS em solução aquosa. Entretanto o condicionamento prévio com H_2O_2 aumenta a captação da clorina pelo fungo, mesmo quando comparado à captação da clorina quando a mesma está em solução de peróxido.

Gráfico 17: Espectroscopia de absorção do AM remanescente na solução após centrifugação e remoção das células.

Gráfico 18: Intensidade de fluorescência do FS no interior das células quando excitado em $\lambda = 490\text{nm}$. Clorina – FS em solução aquosa, MIX – FS em solução de H_2O_2 a 3% e $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Clorina}$ – condicionamento prévio do microrganismo com peróxido e posterior incubação com o FS.

5.4.2 - MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA MORTE BACTERIANA EM PRESENÇA DE PERÓXIDO

Os gráficos 19 e 20 mostram a redução bacteriana nas diferentes seqüências de uso da associação dos fotossensibilizadores e a solução de peróxido de hidrogênio.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes quando o microrganismo foi tratado previamente com o H_2O_2 , quando o fotossensibilizador foi diluído em H_2O_2 , ou quando o microrganismo recebeu a PDT e subsequenteiramente foi atacado com peróxido de hidrogênio. Porém,

estes tratamentos foram mais efetivos do que a PDT utilizando o fotossensibilizador em solução aquosa.

Gráfico 19: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando AM como fotossensibilizador.

	AM + Luz	(AM+H ₂ O ₂)+ Luz	(AM+Luz)+ H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +(AM+Luz)
Redução bacteriana	75,55	98,263	95,536	99,84
Desvio padrão	1,67	2,03	1,82	1,23

Tabela 10: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento utilizando o AM como fotossensibilizador.

Gráfico 20: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento, utilizando o conjugado a base de clorina como fotossensibilizador.

	FS + Luz	(FS+H ₂ O ₂)+Luz	(FS+Luz)+H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +(FS+Luz)
Redução bacteriana	66,91	98,58	96,151	99,61
Desvio padrão	2,98	1,01	2,65	2,4

Tabela 11: Médias e desvio padrão da redução microbiana após diferentes seqüências de tratamento, utilizando o conjugado a base de clorina como fotossensibilizador.

6 - DISCUSSÃO

Trabalhos prévios de nosso grupo utilizaram, tanto *in vitro* como *in vivo*, uma pasta à base de peróxido de uréia e um fotossensibilizador para redução microbiana contra microrganismos orais^{1,44,45,46}. Nestes trabalhos o fotossensibilizador foi associado a uma pasta comumente empregada em odontologia com dois objetivos, primeiramente evitar a pigmentação do elemento dentário assim como dos tecidos adjacentes a este e também com o intuito de facilitar a reação fotodinâmica, aumentando a disponibilidade de oxigênio na área tratada e conseqüentemente a eficiência da terapia. Os resultados obtidos nesses trabalhos, assim como os trabalhos de MacCullagh e Robertson^{47,49} motivaram a continuação daqueles estudos, para verificar se a adição de peróxido de hidrogênio poderia melhorar a eficiência da terapia fotodinâmica, principalmente sobre microrganismos Gram- e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nesta associação.

Nos estudos supracitados^{44,45,46}, foi verificado o aumento da eficiência fotodinâmica, em bactéria Gram+ e em flora microbiana oral de cães. Também pode ser constatada na literatura a eficiência da PDT sobre algas e cianobactérias, em presença de peróxido de hidrogênio. Para verificar a redução microbiana em diferentes microrganismos foram selecionadas neste estudo as bactérias: *S. aureus* uma bactéria Gram+, *P. aeruginosa* e *E. coli* bactérias Gram- e o fungo *C. albicans*.

Os resultados obtidos mostraram um aumento na morte microbiana quando da associação da PDT com o H₂O₂, confirmando os resultados anteriores e demonstrando que este efeito pode ser obtido sobre diferentes

microrganismos, tanto Gram+ quanto Gram- e desde células procariontes até células eucariontes, *in vitro* ou *in vivo* em feridas contaminadas. A adição de H_2O_2 não interferiu de forma significativa na dinâmica de ação da PDT quanto à susceptibilidade dos microrganismos ao tratamento com ou sem a presença do peróxido de hidrogênio, apenas apresentando uma maior redução microbiana, e isso foi ressonante com os achados da literatura, isto é bactérias Gram+ continuaram a sofrer maior redução do que fungos e bactérias Gram- . A susceptibilidade do microrganismo à PDT é dividida às características morfofisiológicas dos mesmos e essa característica não foi alterada pela ação do peróxido.

Estes dados também indicam que quanto maior a concentração utilizada de H_2O_2 , maior foi a redução microbiana obtida. Este achado poderia indicar que é um efeito simples da somatória do efeito antimicrobiano das duas terapias, porém, a soma da toxicidade intrínseca do fotossensibilizador associado ao peróxido (em sua maior concentração) na ausência de irradiação, somado à morte microbiana resultante da PDT, os valores não atingem os obtidos pela PDT associada ao peróxido, mostrando não ser esta a dinâmica presente.

Para confirmar a hipótese de que o aumento da concentração de oxigênio disponível no meio, facilitaria a formação de espécies reativas de oxigênio, devido à maior probabilidade de transferência de energia ou transferência eletrônica entre o fotossensibilizador excitado e o substrato, foi avaliada a concentração de O_2 disponível presente na água destilada e em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1M. Os dados indicam que a solução de peróxido de hidrogênio apresenta, em temperatura ambiente, concentrações de

O₂, aproximadamente 25% superiores as da água destilada. Este aumento da presença de O₂ dissolvido na solução de peróxido valida a hipótese proposta e explicaria os valores mais elevados de redução microbiana obtidos em nosso estudo, para todos os microrganismos avaliados.

Foote¹² afirma que em um ambiente rico em oxigênio há um predomínio da reação do tipo II, com formação de oxigênio singleto, devido a um processo de transferência de energia entre o fotossensibilizador excitado e o oxigênio tripleto. De Rosa⁶¹ complementa afirmando que este processo geralmente resulta na formação de 10³ a 10⁵ moléculas de oxigênio singleto.

O esperado para que confirmássemos a hipótese proposta era um aumento de até 25% na formação de oxigênio singleto, visto que em solução de peróxido foi este o valor encontrado da disponibilidade de O₂, quando comparado à água destilada. Contudo, quando os mecanismos envolvidos nesta foto-reação foram avaliados *in vitro*, diferentemente do esperado, a produção de oxigênio singleto diminuiu quando o fotossensibilizador sofreu irradiação em presença de peróxido, comparado aos valores obtidos em solução aquosa. Os gráficos 9 e 10 mostram os valores relativos à formação de reação tipo II.

Os métodos espectrofotométricos de detecção utilizados neste estudo, foram métodos indiretos e os dados poderiam sofrer alterações visto que o composto RNO, não é oxidado diretamente pelas ERO. Sua oxidação se deve à captura do oxigênio singleto pela L-histidina, o que resulta na formação de uma substância intermediária capaz de induzir processos oxidativos neste composto e ainda, estas reações ocorrem em momentos distintos da detecção. De acordo com Kralik *et al.*⁴¹, na ausência de L-histidina, o RNO pode reagir

com as ERO, mas esta reação é fraca e não significativa. Para confirmar estes resultados foi realizado um experimento para a detecção direta do oxigênio singlete através de sua emissão fosforescente em $\lambda=1270\text{nm}$. A detecção por ser direta e em tempo real, confirmou a diminuição da formação de oxigênio singlete, ratificando os dados obtidos anteriormente.

MacCullagh e Robertson^{47,49} trabalhando em uma atmosfera livre de oxigênio, substituído por argônio relataram a redução microbiana de algas e cianobactérias, sugerindo que a presença de oxigênio atmosférico não é necessária para que a reação fotodinâmica ocorra. Os autores concluem que na presença de peróxido de hidrogênio o AM apresenta formação de espécies reativas de oxigênio por reação do tipo I e também por reação do tipo II. Os mecanismos para a reação tipo I sugeridos nesse trabalho, indicam que o azul de metileno foto-excitado transfere um elétron para o H_2O_2 levando à formação de um radical hidroxila ou um radical hidroperoxila. Este possível mecanismo faz referência ao trabalho de Gak e colaboradores⁴⁸. Esses autores investigaram a supressão do estado tripleto do fotossensibilizador foto-excitado pelo H_2O_2 e sugerem três possíveis caminhos para a reação: transferência de elétrons do FS excitado para o H_2O_2 com a formação de um radical cátion do FS e OH, transferência de elétrons do H_2O_2 para a molécula do FS com a formação de um radical anion do FS e HO_2^* ou supressão do estado tripleto excitado pelo H_2O_2 sem a formação de nenhum subproduto.

Nossos resultados indicam claramente que a reação tipo II é diminuída na presença de H_2O_2 , restando, portanto, investigar a formação de ERO por reação tipo I para tentar justificar a hipótese inicial.

Para isto foi avaliada a formação das ERO totais e radicais superóxido em suspensão e em suspensão na presença de microrganismos

LeBel⁵⁰ e Gomes⁵⁴ indicam a utilização de compostos de fluoresceína para a detecção de espécies reativas de oxigênio, em especial os radicais hidroxila, LeBel recomenda a utilização do DCFH-DA como um interessante método, desde que utilizado com cuidado por ser este um método indireto, que depende de diversas reações intermediárias para seu correto funcionamento. Tegos⁵, baseado no trabalho de Yamakoshi⁴², utiliza-se de um outro método também indireto para detecção de ERO mais seletivo para os radicais superóxidos. Bourré⁵¹, também utilizando o DCFH, indica este composto para a detecção de ERO em células.

Estes métodos empregados nesse estudo, com mecanismos distintos, avaliam de maneira específica dois radicais livres, mas como já citado anteriormente, por serem as espécies reativas de oxigênio moléculas de difícil detecção, eles avaliam como um todo as fotorreações do tipo I, mas com sensibilidade aumentada para as duas moléculas citadas, e detectam também, de maneira inespecífica, outras ERO.

Interpretando os resultados em conjunto podemos ter um panorama geral das reações fotoquímicas em presença de H_2O_2 , e em específico dos radicais hidroxila e superóxido tanto intracelular como em reações em suspensão.

A formação de espécies reativas de oxigênio, como se pode notar pela análise dos gráficos 13, 14, 15 e 16, também demonstrou uma diminuição na produção de ERO quando a reação fotodinâmica ocorreu na presença de peróxido de hidrogênio. Estes resultados estão em desacordo com a teoria de

Gak e colaboradores⁴⁸, que sugerem que o azul de metileno fotoexcitado transfere um elétron para o H_2O_2 levando à formação de um radical hidroxila.

Os dados obtidos em nossos experimentos invalidariam a hipótese de que uma maior disponibilidade de oxigênio no meio, proporcionada pelo uso de H_2O_2 , resultaria em uma maior produção de ERO, pelo contrário, a adição de H_2O_2 estava inibindo a fotorreação, tanto para reações do tipo I como do tipo II.

Como já vimos em nossos resultados e fundamentados na literatura^{1,46,47,49}, a adição de H_2O_2 aumenta a morte microbiana, portanto, outro mecanismo adicional aos mecanismos fotofísicos ou fotoquímicos deve estar ocorrendo para justificar um aumento na eficiência fotodinâmica.

Analisando por um aspecto fotobioquímico, a PDT com o fotossensibilizador aderido à membrana do microrganismo, mesmo com a diminuição de ERO formadas, poderia provocar rupturas na membrana, como visto por Caetano⁵⁹ em vesículas gigantes unilamelares, que facilitaria o acesso do H_2O_2 ao interior da célula.

Para verificar esta hipótese, foi avaliada a produção de ERO no interior de *C. albicans*. A figura 1 mostra a dinâmica de formação de DCF resultante da oxidação do composto DCFH no interior do microrganismo após irradiação do azul de metileno como descrito por Bourré⁵¹. Baseado nas imagens de microscopia, obtidas na presença e na ausência de H_2O_2 , a análise das intensidades de fluorescência em função do tempo de irradiação forneceu graficamente a cinética de formação do DCF. Os dados contidos no gráfico 17 mostram que na análise em suspensão na ausência de células, e utilizando-se de células eucariontes de *C. albicans* há, no interior das células, uma maior formação de ERO na presença de peróxido, principalmente nos momentos

iniciais da irradiação do FS.

Como para a realização deste experimento, após incubação por 5 minutos, o DCFH não incorporado ao microrganismo for removido por centrifugação, podemos notar pelas figuras 1 e 2, que a formação das ERO ocorreu no interior da célula e/ou em contato íntimo com sua membrana celular, isto é, na proximidade de estruturas vitais para sobrevivência do microrganismo, possivelmente aumentando o dano oxidativo.

Nossos resultados conflitantes nos experimentos em solução poderiam ser explicados em função do pH do meio onde foram realizadas as reações, visto que a solução de peróxido de hidrogênio possui um pH 3, e em pH ácido, o tempo de vida do estado tripleto é diminuído, por este ser um estado característico de meios básicos^{60,61,62}. Este fato poderia influenciar a probabilidade do mesmo reagir com oxigênio ou diminuir a capacidade de detecção das espécies reativas. Entretanto, nos experimentos com o uso do DCFH-DA, tanto na reação em solução quanto na reação intracelular, o pH das soluções fotossensibilizadoras foi estabelecido em 4, mostrando que em pH semelhante a dinâmica das reações se mantém inalterada.

Para tentar elucidar os mecanismos adicionais, responsáveis pelo aumento da morte microbiana, foram realizados experimentos onde foram alteradas as seqüências das etapas da PDT, para determinar se havia uma relação sinérgica entre a PDT e o H_2O_2 , ou se estas terapias estariam agindo seqüencialmente.

Os gráficos 19 e 20 mostram que a alteração das etapas da PDT não apresentou diferenças estatísticas significantes entre elas, indicando apenas

que o uso do H_2O_2 previamente à PDT conduz a um ligeiro aumento na redução bacteriana de *E. coli*.

Estudando o comportamento e a resistência bacteriana sob condições extremas e mudanças fisiológicas associadas a *stress* oxidativo, Baatout e colaboradores⁶³ mostraram que as cepas bacterianas testadas exibiram sensibilidade diferente ao H_2O_2 exógeno. Para todas as cepas estudadas pelos autores (*Ralstonia metallidurans*, *E. coli*, *Shewanella oneidensis* e *Deinococcus radiodurans*), algum dano pôde ser observado, como alteração na permeabilidade de membrana, no potencial de membrana, na atividade enzimática e alteração considerável do pH, quando concentrações mais altas de H_2O_2 foram utilizadas.

Baixas concentrações em doses únicas de peróxido de hidrogênio causam dramático aumento no acúmulo de substâncias com diferentes propriedades físico-químicas, para diferentes tipos celulares. Segundo Funk and Krise⁶⁴, isso se deve possivelmente a uma alteração na difusão da membrana. Este condicionamento da célula com H_2O_2 facilitou o acúmulo das substâncias amarelo lucifer, verde de oregon e daunorubincina em diferentes tipos celulares (HL-60 e fibroblastos humanos).

Os resultados dos experimentos de captação do fotossensibilizador pela *E. coli* e *C. albicans* são consistentes com os achados de Funk and Krise⁶⁴, mostrando maior captação dos FS tanto após condicionamento prévio com H_2O_2 , como quando associado a este. Este maior acúmulo de fotossensibilizador no interior do microrganismo, próximo de importantes sítios de ação da PDT, como material genético e enzimas citoplasmáticas, pode explicar o aumento na morte do microrganismo.

Uma segunda possibilidade deve ser considerada, a possível ação sinérgica das terapias. A PDT pode estar agindo sobre os microrganismos provocando morte em alguns, mas produzindo danos subletais em outros. O mesmo pode estar ocorrendo com o H_2O_2 , entretanto, quando agindo sinergicamente, os danos subletais produzidos por cada uma das terapias em separado produzem danos letais, resultando assim em maior eficiência na redução microbiana.

Os resultados mostram que a dinâmica de ação da PDT associada ao H_2O_2 independe da natureza do FS, pelo menos para os FS utilizados neste estudo. Tanto em moléculas maiores como o conjugado a base de clorina quanto em uma molécula mais simples, como o azul de metileno, ocorre um aumento na redução microbiana e maior captação do FS pelo microrganismos após condicionamento com H_2O_2 .

7- ESTUDOS FUTUROS ADICIONAIS

Para melhor entender e confirmar os achados deste estudo deve ser realizada a detecção de espécies reativas de oxigênio no interior dos microrganismos, utilizando-se compostos que podem modificar a dinâmica da fotorreação, como supressores de radicais livres, antioxidantes ou substâncias potencializadoras da reação, como deutério, para verificar *in situ* a ação destes agentes sobre a reação fotodinâmica.

Estudos em células, principalmente em oncologia, podem se beneficiar do aumento da eficiência da terapia fotodinâmica exposta neste estudo.

O desenvolvimento de veículos mais apropriados para utilização clínica, principalmente em dermatologia e odontologia, deve ser estudado, viabilizando aplicações clínicas destes achados.

CONCLUSÃO

Conclusões específicas

- A concentração de oxigênio molecular disponível em uma solução de peróxido de hidrogênio em ppm é maior do que a encontrada na água destilada;
- O uso de ambos os fotossensibilizadores em solução de H_2O_2 aumenta a redução microbiana para todos os microrganismos estudados. O aumento na morte microbiana é maior, respectivamente, para bactérias Gram+, bactérias Gram- e fungos;
- Os mecanismos fotofísicos e fotoquímicos na presença de H_2O_2 apresentam uma diminuição na formação de ERO para ambos os FS;
- O condicionamento prévio com H_2O_2 ou o uso do FS em solução de peróxido leva a uma maior captação do FS pela célula;
- A PDT na presença de H_2O_2 , o condicionamento prévio do microrganismo com H_2O_2 seguido da PDT ou a ação da PDT seguido do H_2O_2 , não promove diferença significativa na redução microbiana, entretanto, estes valores são diferentes dos valores de redução microbiana obtida com o FS em solução aquosa.

Conclusões gerais

De acordo com a metodologia utilizada e baseada nas análises dos dados obtidos, podemos concluir que:

A presença de peróxido de hidrogênio aumenta a eficiência da terapia fotodinâmica antimicrobiana nas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos estudados.

Os dados obtidos neste estudo, indicam que os mecanismos envolvidos neste processo são consequência de uma reação sinérgica fotobioquímica relacionada à reação tipo I e aumento da permeabilidade de membrana celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Garcez AS, Nunez SC, Souza FR, Katter JM, Ribeiro MS. Terapia Fotodinâmica em Odontologia – Laser de Baixa Potência para Redução Microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2003; 57:223 – 226
- 2 Demidova TN, Hamblin MR . Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores mediated by phenothiazinium dyes. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71:6918-25
- 3 Hamblin MR, Hassan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem photobiol Sci*. 2004; 3:436-50
- 4 Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) *J Antimicrobial Chemotherapy*. 1998; 42:13-28
- 5 Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50; 1402-10
- 6 Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol*. 1995; 78: 569-74
- 7 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001; 29: 165-73
- 8 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B*. 2003; 71: 87-98

-
- 9 Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 196-203
- 10 Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immun Med Microbiol.* 2003; 39: 17-22
- 11 Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol.* 1998; 68: 370-6
- 12 Foote CS. Definition of type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991; 54: 659
- 13 Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol.* 1997; 65: 441-5
- 14 Melly E, Cowan AE, Setlow P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J Appl Microbiol.* 2002; 93: 316-25
- 15 de Haas ER, Kruijt B, Sterenborg HJ, Martino Neumann HA, Robinson DJ. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 2679-86.
- 16 Nunez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas Azul de Metileno e Azul de Orto –Toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. Tese doutorado IPEN/CNEN SP 2007
- 17 Ackroyd R, Kelly C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001; 74: 656-669

-
- 18 Yoshikawa TT. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50: 226-9
- 19 Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;16: 3-10
- 20 Wise R, Hart T, Cars O. Antimicrobial resistance. *Br Med J.* 1998 37: 609-10
- 21 Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 883-7
- 22 Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992; 25: 77-81
- 23 Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 182-7
- 24 Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 253-9
- 25 Sailer R., Strauss W.S.L., König K., Rück A., Steiner R. Correlation between porphyrin biosynthesis and photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with 5-aminolaevulinic acid. *J Photchem Photobiol B.* 1997; 39: 236-42
- 26 Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J.* 1997; 42: 302-6
- 27 Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 2595-601

-
- 28 Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999; 14: 150-7
- 29 Kawamoto K, Senda N, Shimada K, Ito K, Hirano Y, Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. *Lasers Med Sci.* 2000; 15: 257-62
- 30 Silbert T, Bird PS, Milburn GJ, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. *J Dent Res.* 2000; (IADR abstracts) 79: 569
- 31 Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007; 22: 83-91
- 32 Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 59-66
- 33 Ovchinnikov IS, Tuchin VV. Photodynamic action on some pathogenic microorganisms of oral cavity. ECBO 2001
- 34 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 165-73
- 35 Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49: 941-51

-
- 36 Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 155-60
- 37 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003; 71: 87-98
- 38 O’Riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiag Photodynamic Ther.* 2005; 2: 247-62
- 39 Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006; 25: 505-19
- 40 Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1402-10
- 41 Kralic I and Mohsni SE. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* 1978; 28: 577–581
- 42 Yamakoshi Y, Umezawa A, Ryu K, Arakane N, Miyata Y, Goda T, Masumizu T, Nagano T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O₂^{*} versus ¹O₂. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 12803–12809
- 43 Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections:

basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38: 468-81

44 Garcez AS, Nunez SC, Zezzel DM, Ribeiro MS. Um novo agente fotossensibilizador para terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: PDT 2002, São Pedro. Resumos - Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações, 2002; 175-6

45 Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, Ribeiro MS. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76: 1275-81

46 Silva Garcez A, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: e93-8

47 McCullagh C, Robertson PK. Photo-dynamic biocidal action of methylene blue and hydrogen peroxide on the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* under visible light irradiation. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 83: 63-8

48 Gak VY, Nadtochenko VA, Kiwi J. Triplet-excited dyes molecules (eosine and methylene blue) quenching by H₂O₂ in aqueous solution. *J Photochem Photobiol A.* 1998; 116: 57-62

49 McCullagh C, Robertson PK. Photosensitized destruction of *Chlorella vulgaris* by Methylene Blue or Nuclear Fast Red combined with hydrogen peroxide under visible light irradiation. *Environ Sci Technol.* 2006; 40: 2421-5

-
- 50 LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5: 227-31
- 51 Bourre L, Thibaut S, Briffaud A, Rousset N, Eleouet S, Lajat Y, Patrice T. Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J Photochem Photobiol B*. 2002; 67: 23-31
- 52 Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide, *Anal. Biochem*. 1965; 11: 1-5
- 53 Wan XS, Zhou Z, Kennedy AR. Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells. *Radiat Res*. 2003; 160: 622-30
- 54 Gomes A, Fernandez E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reative oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005; 65: 45-80
- 55 Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta*. 2006; 3681: 53-76.
- 56 Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, Baumler W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 7223-8
- 57 Korystov YN, Shaposhnikova VV, Korystova AF, Emel'yanov MO. Detection of reactive oxygen species induced by radiation in cells using the dichlorofluorescein assay. *Radiat Res*. 2007; 168: 226-32
- 58 Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*. 1997; 23: 648-650

-
- 59 Caetano W, Haddad PS, Itri R, Severino D, Vieira VC, Baptista MS, Schroder AP, Marques CM. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir*. 2007; 23: 1307-14
- 60 Skovsen E, Snyder JW, Lambert JDC, Ogilby PR. Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a cell. *J Phys Chem B*. 2005; 109: 8570-3
- 61 Deroa MC, Crutchley RJ. Photosensitised singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*. 2002; 133-134: 351-71
- 62 Gorman AA, Rodgers MAJ. Current perspective of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1992; 14: 159-76
- 63 Baatout S, De Boever P, Mergeay M. Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2006; 42: 418-27
- 64 Funk RS and Krise JP. Exposure to Hydrogen peroxide can increase the intracellular accumulation of drugs. *Mol Pharm*. 2007; 4: 154-9