INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA DINÂMICA DE FOTODEGRADAÇÃO E
AGREGAÇÃO DAS FENOTIAZINAS AZUL DE METILENO E AZUL
DE ORTO-TOLUIDINA COM RELAÇÃO À EFICIÊNCIA
FOTODINÂMICA**

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ

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

Orientadora:

Dra. Martha Simões Ribeiro

SÃO PAULO

2007

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA DINÂMICA DE FOTODEGRADAÇÃO E
AGREGAÇÃO DAS FENOTIAZINAS AZUL DE METILENO E AZUL
DE ORTO-TOLUIDINA COM RELAÇÃO À EFICIÊNCIA
FOTODINÂMICA**

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ

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

Orientadora:

Dra. Martha Simões Ribeiro

SÃO PAULO

2007

Aos meus pais, gratidão, orgulho, amor e respeito são meras palavras que tentam expressar meus sentimentos por vocês.

Ao Hector, meu melhor amigo e companheiro, dedico a você, não só este trabalho, mas todo meu amor.

À Mavilde, irmã, amiga e sem dúvida, inspiração e exemplo para este trabalho, tudo começou com você.

Ao Marcos, amigo, irmão e companheiro sem dúvida você é especial.

À Juliana pessoa fantástica, amiga e parceira não imagino minha vida sem você.

AGRADECIMENTOS

Provavelmente deveria agradecer a todos que me conhecem pela paciência e compreensão oferecidas a mim durante a execução deste trabalho. Cito entretanto, algumas pessoas que, de forma especial, dedicaram seu tempo e conhecimento a mim possibilitando a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, uma amiga para toda a vida, sem dúvida, uma pessoa especial que me guiou durante estes anos, entre mares calmos e tempestades, mais do que minha gratidão, você tem minha amizade eterna.

Ao Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, não só lhe agradeço os conhecimentos transmitidos e a paciência, mas sobretudo o exemplo de pesquisador e professor que você é para todos nós que tivemos a oportunidade de partilhar um trabalho com você.

Ao Prof. Dr. Laércio Gomes pelas brilhantes idéias que com certeza iluminaram meu caminho.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista, sua colaboração foi essencial.

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

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell por sua colaboração, amizade e companheirismo desde o início.

À Profa. Dra. Sonia Baldochi por ter aberto as portas de seu laboratório.

À Profa. Dra. Izilda Márcia Ranieri pela confecção dos filtros utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. André Felipe Librantz pela sua disposição, colaboração e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Jorge Sarkis por ser um excelente vizinho de orientadora.

Ao Prof. Dr. Niklauss Ursus Wertter por sua colaboração e pelas idéias sugeridas.

Ao amigo e companheiro de trabalho Aguinaldo, que esteve junto durante todo o tempo, nos bons e nos maus momentos, devo dizer que este é nosso trabalho.

À Daniela, por estar sempre próxima e disposta a colaborar.

Ao Anderson, pela colaboração, pelas discussões e apoio.

À Helena Junqueira, pela paciência e colaboração.

Ao José Pucci, pela colaboração nas medidas realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

Ao Renato, sempre pronto para viajar..... e claro, à Ilka, que acabou viajando junto.....

A todos meus colegas de laboratório Aécio, Karen, China, Cris, Tatiana, Stella, Ricardo e Daniel, pela colaboração e pelas boas idéias surgidas no escritório.

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

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

Aos funcionários do CLA, sempre tão atenciosos.

Ao IPEN, pela estrutura oferecida, que possibilitou a excussão deste trabalho.

A todos os funcionários da divisão de ensino do IPEN.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A MMOptics, pelo desenvolvimento do LED utilizado nesta pesquisa.

A todos meus amigos.... Muito obrigada.

ESTUDO DA DINÂMICA DE FOTODEGRADAÇÃO E AGREGAÇÃO DAS FENOTIAZINAS AZUL DE METILENO E AZUL DE ORTO-TOLUIDINA COM RELAÇÃO À EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ

RESUMO

A terapia fotodinâmica apresenta-se como uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de infecções localizadas, porém, para sua aplicação clínica, as variáveis relacionadas à eficiência fotodinâmica devem ser analisadas para a obtenção de resultados satisfatórios. Os objetivos deste trabalho foram investigar a dinâmica de agregação dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de orto-toluidina em diferentes solventes, caracterizar os solventes em relação ao oxigênio molecular disponível em cada solução e seu respectivo pH, observar o efeito da temperatura, sangue e saliva na agregação dos fotossensibilizadores, monitorar a dinâmica de fotodegradação em função da exposição radiante e irradiância, avaliar a eficiência fotodinâmica microbiologicamente e através da produção de $^1\text{O}_2$. Os solventes utilizados foram água deionizada, água destilada, água estéril, solução salina 0,9% e solução salina 0,45%. Em cada uma das soluções, foi realizado teste de pH e medição de oxigênio dissolvido por sonda apropriada. Os efeitos de fluidos, temperatura e concentração na agregação dos fotossensibilizadores foram analisados através de espectroscopia de absorção óptica. A dinâmica de fotodegradação foi testada com diferentes exposições radiantes e irradiâncias, nos comprimentos de onda adequados para cada composto. As irradiações foram realizadas com emissão de banda larga e banda estreita. A eficiência fotodinâmica foi avaliada através da medição direta da luminescência do oxigênio singleto em $\lambda=1270\text{nm}$, em dois solventes. Testes microbiológicos foram realizados com culturas de *Escherichia coli*. Os resultados obtidos demonstram que a dinâmica de agregação está diretamente relacionada com solvente e concentração: a solução salina apresentou diferença em relação aos demais solventes em todos os quesitos analisados. Dos solventes testados, a água deionizada apresentou os melhores resultados. A dinâmica de fotodegradação está relacionada, em sua magnitude, com a exposição radiante e, em sua dinâmica, com a irradiância. O uso de banda larga para irradiação foi mais efetivo para na fotossensibilização letal. Portanto, para a aplicação clínica da terapia, o substrato deve ser considerado. Apropriadas condições de irradiação, solvente e concentração de fotossensibilizador aumentam a eficiência do processo.

STUDY OF THE AGGREGATION AND PHOTOBLEACHING DYNAMIC OF METHYLENE BLUE AND ORTO-TOLUIDINE BLUE AS REGARDS THEIR PHOTODYNAMIC EFFECTIVENESS

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ

ABSTRACT

Photodynamic therapy may be a viable alternative to treat localized infections, although to obtain a resourceful clinical application, parameters linked with photodynamic efficiency must be analyzed in order to achieve quantifiable results. The aims of this study were to investigate the aggregation dynamic of the photosensitizers methylene blue and orto-toluidine blue in different solvents; to characterize the solvents regarding to available molecular oxygen and pH; to observe the effect caused by temperature, blood and saliva on photosensitizer aggregation, to monitor the photobleaching dynamic as a function of fluence and irradiance, and to evaluate the photodynamic efficiency in such conditions. The tested solvents were deionized water, distilled water, sterile water, and saline solution 0.9%. In each solution, the pH and molecular oxygen availability were measured with the appropriated device. The effects of organic fluids, temperature and concentration on aggregation were analyzed through optical absorption spectroscopy. The photobleaching dynamic was tested regarding radiant exposure and irradiance with the appropriated wavelength for each compound. The irradiations were performed with broad band and narrow band light sources. The photodynamic efficiency was evaluated through singlet oxygen luminescence measurement in $\lambda=1270\text{nm}$ and microbiological tests were performed with cultures of *Escherichia coli*. The results demonstrated that the aggregation dynamic is directly linked with solvent and concentration: the saline solution presented different results in all tested conditions. Deionized water presented the best results. The photobleaching dynamic is correlated in its magnitude with the radiant exposure and its dynamic is associated with irradiance. The use of broad band to perform the irradiation was considered more effective for lethal photosensitization. Therefore, for the clinical application of this therapy, the substrate must be taking into account, and appropriated parameters of irradiation and photosensitizer presentation increase the efficiency of the process.

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 - Sequência de testes realizados para análise dos parâmetros de fotodegradação.....	38
Tabela 2 - Sequência de testes realizados para análise das bandas de irradiação.....	40
Tabela 3 - Sequência de testes microbiológicos realizados para análise da exposição radiante e irradiância.....	45
Tabela 4 - Média e desvios padrão da quantidade de O ₂ dissolvido nos solventes analisados.....	47
Tabela 5 – Valores de pH obtidos nos solventes puros e após dissolução dos corantes.....	49
Tabela 6 - Valores da redução bacteriana para o teste de solventes com AM e AT.....	95
Tabela 7 – Valores da redução bacteriana para o teste de concentração com AM e AT.....	99
Tabela 8 - Valores da redução bacteriana para o teste de irradiância com AM e AT.....	102
Tabela 9 - Valores da redução bacteriana para o teste de exposição radiante com AM e AT.....	105

Tabela 10 - Valores da redução bacteriana para o teste de fontes de irradiação com AM.....	107
--	-----

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado.....	9
Figura 2 - Redução tetravalente do oxigênio molecular	12
Figura 3 - Esquema representativo da membrana de bactérias Gram-positivas (A) e bactérias Gram-negativas (B).....	22
Figura 4 - Dispositivo para irradiação das amostras.....	37
Figura 5 - Espectro de transmissão do filtro utilizado nos testes de banda larga.....	39
Figura 6 – Modo de Irradiação das amostras microbiológicas.....	43
Figura 7 - Box Plot dos valores de oxigênio dissolvido nos solventes testados.....	48
Figura 8 - Espectros de absorção de solução de AM em água deionizada nas concentrações de 250, 20 e 10µg/mL.....	51
Figura 9 - Relação dos picos de absorção máxima de dímeros e monômeros para AM em água deionizada nas concentrações de 3µM, 30µM, 60µM, 120µM, 240µM e 480µM.....	52
Figura 10 – Espectros de absorção de AT água deionizada nas concentrações de 1000µg/mL a 100µg/mL.....	53
Figura 11 - Relação AD/AM para AT nas concentrações de 3,2mM a 16µM.....	53
Figura 12 – Espectros de absorção da dinâmica de agregação de AT nas concentrações de 10µg/mL a 50µg/mL.....	54
Figura 13 – Espectros de absorção do AT em solução salina 0,45% e água destilada, nas concentrações de 10µg/mL e 15µg/mL.....	58
Figura 14 - Relação AD/AM de AT em solução salina 0,45% e água destilada nas concentrações e 10µg/mL e 15 µg/mL.....	59

Figura 15 – Espectro de absorção do AM 10 $\mu\text{g/mL}$ em solução salina 0,9% e água deionizada e relação AD/AM (<i>insert</i>).....	60
Figura 15a - Espectro de fluorescência do AM 30 μM (10 $\mu\text{g/mL}$) em solução salina 0,9% e água deionizada com excitação em $\lambda=532\text{nm}$	60
Figura 16 – Espectro de absorção do AT 10 $\mu\text{g/mL}$ em solução salina 0,9% e água deionizada e relação AD/AM (<i>insert</i>).....	61
Figura 17 - Espectros de absorção da solução de AT 100 $\mu\text{g/mL}$ em solução salina 0,9%, e em solução contendo saliva e soro de sangue.....	63
Figura 18 – Razão AD/AM para AM após mistura com saliva nos tempos imediato, 1min e 5min.....	64
Figura 19 - Espectros de absorção de AT em água deionizada a 100 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ nas temperaturas de 22°C e 37°C.....	66
Figura 20 – Espectros de absorção de AT em solução salina 0,9% a 100 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ nas temperaturas de 22°C e 37°C.....	66
Figura 21 - Espectro de emissão do LED (eixo esquerdo) com as respectivas faixas de potência e espectros de absorção do AM e AT (eixo direito).....	69
Figura 22 – Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução de AT com os parâmetros de 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s.....	70
Figura 23 - Valores da razão AD/AM para AT após irradiações 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s.....	71
Figura 24 - Absorção de monômeros e dímeros de AT 30 μM em solução aquosa normalizada.....	71
Figura 25 - Razão calculada entre os picos de absorção máxima do AT no ultravioleta e no visível.....	72
Figura 26 – Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução de AT com potência de 40mW e tempos de exposição de 1, 2, 3, 4 e 5 min.....	76
Figura 27 - Valores da razão AD/AM para AT após irradiações com 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.....	77

Figura 28 - Absorção de monômeros e dímeros de AT 30 μ M em solução aquosa normalizada.....	77
Figura 29 – Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução de AM com os parâmetros de 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s.....	79
Figura 30 - Valores da razão AD/AM para AM após irradiações 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s.....	80
Figura 31 - Absorção de monômeros e dímeros de AM 30 μ M em solução aquosa normalizada.....	80
Figura 32 - Razão calculada entre os picos de absorção máxima do AM no ultravioleta e no visível.....	81
Figura 33 – Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução de AM com os parâmetros de 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.....	82
Figura 34 - Valores da razão AD/AM para AM após irradiações com 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.....	83
Figura 35 - Absorção de monômeros e dímeros de AM 30 μ M em solução aquosa normalizada.....	83
Figura 36 - Espectros de absorção de solução aquosa de AM 30 μ M inicial e após irradiação com laser e Led (180seg-40mW) e Led e filtro (180seg-50mW).....	87
Figura 37 - Espectros de fluorescência de solução aquosa de AM 30 μ M inicial e após irradiação com laser e Led (180seg-40mW) e Led e filtro(180seg-50mW).....	88
Figura 38 - Razão da AD/AM calculada para as soluções de AM 30 μ M inicial e após irradiação com laser e Led (180seg-40mW) e Led e filtro.....	89
Figura 39 - Absorção de dímeros e monômeros normalizada para as condições de laser e Led (180seg-40mW) e Led e filtro (180seg-50mW).....	89

Figura 40 - Intensidade da emissão transiente do oxigênio singleto em $\lambda=1270\text{nm}$ em solução de AM $30\mu\text{M}$ nos solventes: água deionizada e solução salina 0,9%.....	91
Figura 41 - Emissão transiente do oxigênio singleto em $\lambda = 1270\text{nm}$ em solução salina 0,9% e água deionizada	92
Figura 42 - Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos nas soluções de AM em água e em solução salina 0,9%.....	93
Figura 43 - Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos nas soluções de AT em água e em solução salina 0,9%.....	94
Figura 44 - Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos com AT nas concentrações de $30\mu\text{M}$ e $300\mu\text{M}$ em água deionizada.....	97
Figura 45 - Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos com AM nas concentrações de $30\mu\text{M}$ e $300\mu\text{M}$ em água deionizada.....	98
Figura 46 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de irradiância com AT.....	101
Figura 47 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de irradiância com AM.....	101
Figura 48 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de exposição radiante com AT.....	104
Figura 49 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de exposição radiante com AM.....	104
Figura 50 – Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de AM com diferentes fontes de irradiação.....	106

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AD/AM – Razão da absorção de dímeros e absorção de monômeros

ALA - ácido aminolevulínico

AM – Azul de Metileno

AT – Azul de orto-toluidina

BHI – *Brain and heart infusion*

°C – Graus Celsius

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

CuZnSOD – Cobre Zinco Superóxido Dismutase

DNA – Ácido Dessoxiribonucléico

ERO – Espécimes Reativas de Oxigênio

FADH - flavina adenina dinucleótido reduzida

FeSOD – Ferro Superóxido Dismutase

FPT - *Freeze-pump-thaw*

Fs - Fotossensibilizador

GaAlAs – Arseneto de Gálio e Alumínio

GSH – Glutathiona

GSSH – Glutathiona oxidada

He-Ne – Hélio-Neônio

HP - Hidroperoxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

Hz – Hertz

InGaAlPO₄ – Fosfato de Índio Gálio e Alumínio

J – Joule

LAM – Leuco-Azul de Metileno

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

LPSs - lipopolissacarídeos

m² – metro quadrado

MCL –Minima Concentração Letal

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

mmHg – milímetro de mercúrio

MnSOD – Manganês Superóxido Dismutase

mW – miliwatt

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida.

nm – nanometro

Nd:YAG – Granada de Ítrio e Alumínio dopada com Neodímio

O₂ – Oxigênio molecular ou dioxigênio

O₂^{•-} - ânion superóxido ou radical superóxido

OH[•] – radical hidroxila

PBS – *Phosphate buffer saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PDT – Terapia Fotodinâmica

PpIX –Protoporfirina IX

ps - picossegundo

RNA – Ácido Ribonucléico

s – segundos

SOD – Superóxido dismutase

ufc – unidades formadoras de colônias

W – watt

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

PÁGINA

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de tabelas	iii
Lista de figuras	v
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	ix
1- Introdução	1
2 - Objetivos	7
3 - Terapia fotodinâmica antimicrobiana	8
3.1 - Princípios da terapia fotodinâmica.....	8
3.2 - Espécies reativas de oxigênio.....	11
3.2.1 - Radical superóxido.....	13
3.2.2 - Peróxido de hidrogênio.....	15
3.2.3 - Radical hidroxila.....	17
3.2.4 - Oxigênio singleto.....	19
3.3 - Aspectos microbiológicos relacionados a PDT antimicrobiana.....	21
3.4 - Terapia fotodinâmica antimicrobiana: fotossensibilizadores fenotiazínicos e fontes de irradiação.....	26
4 - Procedimentos experimentais	32
4.1 - Estudo dos solventes em relação à presença de oxigênio dissolvido e pH.....	32
4.2 - Efeito da concentração e solvente na agregação do corante.....	33
4.3 - Efeito da temperatura sobre a agregação do corante.....	35
4.4 - Efeito de parâmetros físicos da radiação sobre a fotodegradação.....	35
4.5 - Eficiência fotodinâmica.....	40
4.5.1 - Produção de oxigênio singleto.....	40
4.5.2 - Testes microbiológicos.....	41
5 - Resultados e Discussão	47
5.1 - Estudo dos solventes em relação à presença de oxigênio dissolvido e pH.....	47
5.2 - Efeito da concentração e solvente na agregação do corante.....	50

5.2.1 - Concentração.....	50
5.2.2 – Solvente.....	58
5.3 - Efeito da temperatura na agregação do corante	65
5.4 - Efeito de parâmetros físicos da radiação sobre a fotodegradação.....	68
5.4.1 - Caracterização do LED.....	68
5.4.2 - Fotodegradação de azul de toluidina.....	69
5.4.2.1 - Irradiância.....	69
5.4.2.2 - Exposição radiante.....	74
5.4.3 - Fotodegradação de azul de metileno.....	78
5.4.3.1- Irradiância.....	78
5.4.3.2 - Exposição radiante.....	82
5.4.4 - Irradiação com banda estreita e banda larga.....	86
5.5 - Eficiência fotodinâmica	91
5.5.1 - Produção de oxigênio singleto.....	91
5.5.2 - Testes microbiológicos.....	93
6 - Conclusões.....	109
Anexo A - Informações complementares.....	111
Referências bibliográficas.....	116

1- INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade terapêutica que combina o uso de uma droga fotossensibilizadora e luz para causar morte celular. As drogas utilizadas para terapia fotodinâmica são conhecidas como fotossensibilizadores (Fs), ou corantes, e possuem pouca ou nenhuma toxicidade às células na ausência de luz ¹.

Os Fs possuem uma configuração eletrônica estável no estado fundamental; após a absorção de um fóton, a molécula é promovida ao estado excitado singleto, que possui tempo de vida curto (~330-390ps) ². O retorno ao estado fundamental pode se dar através de decaimento não radiativo por conversão interna; por decaimento radioativo via fluorescência; ou pela passagem do Fs no estado excitado, para o estado tripleto de menor energia, envolvendo a mudança de spin de um elétron, com tempo de vida maior (tipicamente da ordem de 500ns). Esta mudança para o estado tripleto promove um maior tempo de vida do estado excitado, aumentando então, a probabilidade de transferência de energia para outras moléculas ³.

A interação do Fs no estado excitado com o meio pode ocorrer em duas formas, descritas como reações do tipo I e tipo II. Na reação do tipo I ocorre a transferência de energia do Fs excitado a um substrato oxidável. A transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio gera um radical no substrato semi-oxidado e corante semi-reduzido. A subsequente reação de ambos com o oxigênio levam à formação de substrato oxidado, à volta do Fs ao estado fundamental e a produção de espécies reativas de oxigênio ⁴, . Na reação do tipo II, o estado tripleto do Fs transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental, a molécula resultante é então o oxigênio singleto, que é um poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células . Sendo assim, os Fs, sob iluminação com o comprimento de onda apropriado, são excitados para promover a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As subsequentes

reações das ERO no meio biológico resultam em inativação das células-alvo através de reações de óxido-redução com lipídeos da membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas. A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada ocorre o efeito fotodinâmico⁵.

A aplicação de luz e corantes para a inativação de microorganismos não é uma descoberta recente, porém, esta técnica não se disseminou na prática clínica, possivelmente devido à grande disponibilidade de agentes antimicrobianos desenvolvidos a partir do descobrimento da penicilina. Após dois anos da introdução da penicilina como agente terapêutico, foram descobertas cepas de bactérias patogênicas resistentes a este agente. A partir de então, começou um fenômeno cíclico: tão logo um novo agente antibiótico era introduzido na terapêutica, bactérias resistentes ao seu mecanismo de ação eram isoladas⁶.

Provavelmente, o notório fenômeno de resistência microbiana, amplamente divulgado nos últimos anos, tenha feito despertar o recente interesse pela PDT antimicrobiana, mesmo empregando Fs conhecidos desde a Segunda Guerra Mundial, como o azul de metileno (AM). Como até o momento não existem evidências de resistência microbiana à PDT⁷, esta modalidade terapêutica pode ser de extremo valor em um futuro próximo, uma vez que a chamada “era antibiótica” pode estar chegando ao fim⁸.

A aplicação da PDT antimicrobiana tem sido proposta para tratar infecções localizadas superficiais, como as de ocorrência mais freqüente na pele e na cavidade oral⁹.

Para a aplicação clínica da PDT antimicrobiana, os compostos fenotiazínicos, mais especificamente o AM e o azul de toluidina (AT), apresentam-se como bons candidatos, devido aos seus comprimentos de onda de absorção máxima ($\cong \lambda=660\text{nm}$ e $\lambda=630\text{nm}$, respectivamente) que apresentam maior

penetração relativa na pele¹⁰, a sua comprovada ação antimicrobiana contra bactérias¹¹, fungos¹² e vírus¹³, sua disponibilidade, já que os compostos comerciais apresentam a mesma efetividade dos purificados,¹⁴ e sua baixa toxicidade, uma vez que, estes compostos são utilizados na área médica para uma série de finalidades terapêuticas como tratamento de metahemoglobinemia¹⁵, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto¹⁶ e como marcador cirúrgico na ressecção de tumores¹⁷, em concentrações muito superiores às utilizadas em PDT.

A susceptibilidade dos microorganismos à PDT varia, sendo estabelecido que, de uma forma geral, os microorganismos Gram positivos são mais susceptíveis à PDT do que os Gram negativos, e os fungos apresentam resistência mais elevada, quando comparados a microorganismos procariotas. As diferentes susceptibilidades devem-se provavelmente às características intrínsecas de cada um destes microorganismos, uma vez que as bactérias se diferenciam pela sua morfologia, composição química, necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e fontes de obtenção de energia¹⁸.

Com exceção de *mycoplasmas* todas as bactérias apresentam, além da membrana plasmática, parede celular com um componente em comum, o peptídeoglicano, que confere rigidez mecânica à célula. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada extra em sua membrana celular, chamada de membrana externa, composta por lipopolissacarídeos¹⁹. Uma importante função da membrana externa é prover permeabilidade à superfície, devido a sua característica hidrofílica, e ao mesmo tempo, os canais de porina presentes na membrana externa, funcionam como filtros, prevenindo a entrada de moléculas maiores ou compostos hidrofóbicos no interior da célula. A complexidade do sistema formado pela membrana externa e parede celular, parece proteger a membrana citoplasmática, prevenindo a ligação de porfirinas e moléculas semelhantes à membrana, o que torna estes compostos ineficazes para a fotoinativação de microorganismos Gram-negativos.

Mesmo com as diferentes susceptibilidades, a terapia mostra resultados promissores em trabalhos *in vivo* ²⁰. Porém, para se instaurar esta terapia de forma efetiva, alguns parâmetros devem ser estabelecidos, uma vez que se variando a concentração e o tipo de Fs, o tempo de pré-irradiação, o tempo de irradiação e a irradiância, a técnica se mostra eficaz na redução de ampla gama de microorganismos .

A eficiência fotodinâmica depende de três elementos básicos: (a) Fs com eficiente rendimento quântico para a produção de estado tripleto; (b) irradiação no comprimento de onda adequado, entregue com apropriada irradiância e exposição radiante e (c) concentração de oxigênio no alvo²¹. Apesar de estes serem os fatores básicos controláveis da terapia, as características das células alvo e o meio em que se encontram podem ter atuação decisiva no sucesso da terapia . Como exemplo, temos os meios ácidos, característicos das infecções, que destroem rapidamente os estados tripletos excitados ²².

A probabilidade de ocorrência de reação do tipo I ou II está ligada à competição entre os processos de transferência de elétrons e transferência de energia. A predominância de reação do tipo I leva à fotodegradação do corante ²³. Estudos realizados com diferentes fotossensibilizadores utilizados em PDT oncológica têm mostrado que a fotodegradação do corante é predominantemente dependente de parâmetros físicos da irradiação e é devida principalmente a altas irradiâncias²⁴. Tem sido proposto que o conhecimento da fotodegradação pode levar ao estabelecimento de parâmetros importantes como exposição radiante e irradiância para a aplicação clínica .

A probabilidade da ocorrência de reação tipo I ou II é também influenciada pela associação do estado fundamental do fotossensibilizador com o meio em que o mesmo se encontra, por isso é importante compreender como as interfaces afetam o estado agregacional de fotossensibilizadores e, conseqüentemente, como isso afeta os processos de transferência de elétrons e transferência de

energia²⁵. O meio onde se localiza o corante pode influenciar seu estado agregacional através de, por exemplo, altas concentrações de sal, que favorecem a formação de dímeros por aumento da constante dielétrica da água diminuindo a repulsão eletrostática entre monômeros. Polieletrólitos, micelas e interfaces em geral podem induzir a formação de agregados através da concentração do corante em uma interface; partículas porosas e proteínas também induzem a agregação, usualmente por promoverem cavidades que estabilizam os agregados. As interfaces podem promover uma diferente distribuição dos reagentes, intermediários e produtos e devido a estes efeitos, mudanças no processo fotoquímico têm sido observadas, tais como: aumento da eficiência na formação de oxigênio singleto, mudanças em tempo de vida e reatividade das ERO formadas e alterações no mecanismo de ação do corante.

O conhecimento atual aponta para variáveis que podem interferir no processo fotodinâmico como, a concentração de O_2 no meio, o pH, a presença de espécies agregadas, o substrato, e os parâmetros de irradiação. Porém, estes dados não foram avaliados com a finalidade de aplicação prática da terapia. A concentração de O_2 é avaliada em PDT oncológica principalmente em relação a fotossensibilizadores derivados de porfirinas e clorinas^{21,23}. Análises fotoquímicas demonstram a dependência do processo em relação ao pH, porém, este fator não é considerado na análise de estudos microbiológicos para a aplicação da PDT antimicrobiana. As espécies agregadas relacionadas as fenotiazinas AM e AT podem ser importantes no processo porém seu papel não está determinado^{11,14}. O substrato conhecidamente altera o processo fotoquímico, porém o papel de fluídos orgânicos e diferentes solventes na agregação e na fotoquímica dos corantes fenotiazínicos não está descrito. A função dos parâmetros de irradiação no resultado final da terapia não é conhecida para estes corantes, visto que, diferentes fontes de irradiação, utilizadas com parâmetros distintos, são empregadas em estudos relacionados a PDT antimicrobiana, sem que maior atenção seja dada a esta variável^{1,6,7,9}.

Neste contexto, o estabelecimento de parâmetros para a aplicação clínica da PDT é dificultado, uma vez que, variáveis que podem interferir no processo não são devidamente conhecidas.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são caracterizar os solventes comumente utilizados em PDT antimicrobiana em relação ao oxigênio molecular disponível em cada solução e seu respectivo pH. Investigar a dinâmica de agregação dos fotossensibilizadores AM e AT em diferentes solventes e analisar o efeito da temperatura, sangue e saliva na agregação destes fotossensibilizadores. Monitorar a dinâmica de fotodegradação do AM e AT em função da exposição radiante, irradiância e largura de banda utilizada para a irradiação. Realizar teste fotoquímico para monitoração da formação de oxigênio singleto em diferentes solventes e executar testes microbiológicos para avaliação da eficiência fotodinâmica antimicrobiana.

3 – TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

O uso terapêutico de radiação visível nas áreas da saúde, aumentou consideravelmente no último século, devido, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico e científico.

A terapia fotodinâmica ou o uso de energia luminosa, sem aumento significativo de temperatura, combinada a uma droga fotossensibilizadora para promover destruição celular localizada, é uma modalidade terapêutica amplamente estudada para o tratamento de injúrias pré-malignas, malignas, infecciosas e degenerativas ²⁶.

O objetivo da PDT é atuar sobre células ou tecidos específicos através do acúmulo seletivo de fotossensibilizador na área alvo, seguido de iluminação localizada ²⁷.

3-1 – PRINCÍPIOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA

O termo fotossensibilização se refere ao processo mediado por luz, que requer a presença de uma substância absorvedora chamada fotossensibilizador ou corante, que inicia processos físicos, químicos e biológicos em um substrato não absorvedor.

O efeito da interação do corante com a radiação é a adição de energia à molécula sensibilizadora. A energia absorvida resulta na mudança do nível de energia dos elétrons para o primeiro estado excitado singlete. O estado singlete sofre rápido decaimento, para o primeiro estado singlete fundamental, via decaimento radioativo (emissão fluorescente), ou não radioativo (conversão interna via emissão de calor); ou para o primeiro estado excitado tripleto, via

intersistemas cruzados, sendo que, o estado excitado tripleto possui maior tempo de vida. Uma vez no estado tripleto, a molécula pode ainda perder a energia excedente via emissão fosforescente .

Os diferentes processos que uma molécula no estado excitado pode sofrer estão representados na FIG. 1²⁸.

Fig.1 Diagrama de Jablonski modificado. S_0 estado fundamental singlete, S_1 primeiro estado excitado singlete, F fluorescência, CIS cruzamento intersistemas, T_1 primeiro estado excitado tripleto, Fos fosforescência, Fs fotossensibilizador, sub substrato .

Na reação do tipo I ocorre a transferência de elétrons do Fs excitado no estado tripleto a um substrato oxidável. A transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio gera um radical no substrato e corante semi-reduzido. A subsequente reação de ambos com o oxigênio levam à formação de substrato oxidado, a volta do Fs ao estado fundamental e a produção de espécies reativas de oxigênio ^{4,5}.

Na reação conhecida como tipo II ocorre a formação de oxigênio singleto, através da transferência de energia do estado tripleto excitado do fotossensibilizador, para o oxigênio molecular .

As probabilidades de ocorrência de reação do tipo I ou do tipo II, dependem das taxas de reação relativas entre o fotossensibilizador-substrato, e fotossensibilizador-oxigênio, uma vez que, estes reagentes competem pelo estado tripleto do corante. Sendo assim, a concentração relativa de oxigênio e de moléculas supressoras no substrato desempenha papel fundamental no tipo de reação ocorrida, depois de apropriada excitação do corante²⁹.

Todos estes processos são dependentes dos respectivos rendimentos quânticos para a ocorrência de cada um deles, ou seja, a quantidade relativa de reação obtida, por fóton absorvido pela molécula. Assim sendo, a probabilidade de transições e o rendimento quântico para o estado tripleto, dependem da velocidade dos processos de cruzamento intersistemas de S_1 para T_1 , de fluorescência e de conversão interna, sendo estas velocidades, características de cada molécula e do meio em que se encontram^{2, 29}.

A molécula em T_1 pode dissipar energia retornando ao estado S_0 por emissão de fóton através do cruzamento intersistemas, ou transferir a energia para uma molécula receptora ressonante no meio. Estes processos determinam o tempo de vida do estado tripleto, dependente portanto da velocidade do processo de cruzamento intersistemas do estado T_1 para o estado S_0 , da velocidade de supressão do estado tripleto por vários supressores (*quenchers* i.e. água) e da concentração destes supressores no meio .

Desta forma, para que o processo apresente alta eficiência é conveniente que a molécula sensibilizadora apresente alto rendimento quântico para estado tripleto, que por sua vez, deve ter um tempo de vida relativamente alto para

permitir a troca de energia ou elétrons entre a molécula e o substrato ou o oxigênio molecular, de forma eficiente, em qualquer meio.

O sucesso da terapia, conforme citado anteriormente depende de um eficiente rendimento quântico para produção de estado tripleto; dos parâmetros de irradiação, da concentração de oxigênio e outras moléculas reagentes no alvo .

Todas as espécies reativas de oxigênio são capazes de em maior ou menor grau causar danos a estruturas biológicas dependendo de sua concentração, sítio de formação e capacidade antioxidante do meio.

3-2 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A toxicidade do oxigênio é reconhecida desde o século XVIII, todos os organismos que utilizam oxigênio em seu metabolismo estão expostos a ele e a seus vários subprodutos, devendo portanto, desenvolver mecanismos capazes de protegê-los desta toxicidade^{30, 31, 32, 33, 35}. Obviamente o oxigênio é tóxico para organismos anaeróbios, porém seus efeitos variam de morte celular a efeito bacteriostático. É menos óbvio contudo, o efeito deletério do oxigênio para microorganismos aeróbios . Altas concentrações de oxigênio, acima do nível atmosférico normal (21%), diminuem o crescimento de plantas e destroem culturas de células animais. Contrariamente, níveis de oxigênio ambiental abaixo de 21% aceleram o crescimento de plantas e culturas de células animais.^{30, 31}.

A toxicidade do oxigênio é o resultado da ação de suas formas parcialmente reduzidas. As espécies tóxicas são formadas por reduções de um ou mais elétrons no oxigênio. Os produtos desta redução incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$). Algumas vezes o termo “radical livre” é utilizado para designar os produtos obtidos após reação do oxigênio. Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes

reativos derivados do oxigênio, pois, alguns destes agentes não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada . Estes compostos são denominados espécies reativas de oxigênio ^{33, 35}.

O dioxigênio (O_2) é um biradical, uma vez que, seus dois elétrons livres habitam dois orbitais diferentes e possuem spins paralelos. A reatividade do dioxigênio é contudo fortemente reduzida devido à restrição de spin. Uma vez que os dois elétrons do oxigênio possuem o mesmo spin, se o dioxigênio oxidar outra biomolécula através da aceitação de um par de elétrons, este par deveria ser paralelo, o que não pode ocorrer se ambos os elétrons habitarem o mesmo orbital. Desta forma, o oxigênio molecular somente poderia reagir com radicais através da aceitação de um elétron. A restrição de spin pode ser superada pela interação do oxigênio com outro centro paramagnético. Metais de transição como o Fe ou Cu são bons catalisadores da redução de um elétron do O_2 . Nas células, a restrição de spin é removida enzimaticamente através da reação do dioxigênio com os metais de transição . A restrição de spin pode também ser removida com a excitação do dioxigênio ao estado singleto .

Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água, através da redução tetravalente do O_2 , representada esquematicamente na FIG. 2. ^{32, 36}.

Figura 2 – Redução tetravalente do oxigênio molecular. ³²

Sendo assim, ao receber um elétron, o oxigênio molecular formará o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), sendo que, em meios ácidos, o $O_2^{\cdot-}$ pode se tornar protonado e formar HOO (radical hidroperoxila); dois elétrons darão origem ao peróxido de hidrogênio, e três elétrons formarão o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), ou, havendo inversão de spin haverá a formação do oxigênio singleto^{32, 33, 35}.

Aproximadamente 2% do O_2 consumido sofre redução univalentemente, recebendo apenas um elétron, formando então a primeira espécie reativa de oxigênio, o radical superóxido. Todas as espécies reativas de oxigênio reagem como oxidantes ou redutores de uma grande variedade de compostos, tanto *in vitro* como *in vivo*. A seguir, serão detalhados os mecanismos de proteção celular e a formação de cada uma das espécies citadas.

3.2.1 - RADICAL SUPERÓXIDO

O radical superóxido, também chamado de ânion superóxido, pode ser escrito como $O_2^{\cdot-}$ ou O_2^- e é formado após a primeira redução do O_2 , que, ganhando um elétron, forma o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

O radical superóxido ocorre em células aeróbias e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos³³. O radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas devido a sua carga neutra, já que o ânion superóxido, por possuir carga negativa, tem sua difusão através de membranas lipídicas inibida^{33,34}. O hidroperoxila representa menos de 1% do total de $O_2^{\cdot-}$ formado em pH fisiológico (7,4), porém sua concentração aumenta significativamente com a queda do pH. Uma vez que, em áreas infectadas e em micro-ambientes próximos à superfície de membranas, uma queda no pH é esperada, a presença de $HO_2^{\cdot}$, deve ser considerada^{3,35}.

O O_2^- pode ser considerado relativamente estável em soluções básicas ou alcalinas e sua taxa de reação é mais lenta do que a do radical hidroperoxila, o que possibilita, em pHs neutros, a reação do O_2^- com compostos polifenólicos, ascorbatos, catecolaminas, leucoflavinas, entre outros³⁶.

A velocidade de reação destes radicais, em pH 4,8, segue a seguinte ordem :

A formação do radical superóxido pode ocorrer via reação do fotossensibilizador com o substrato e este, então, reagir com o O_2 fornecendo um elétron.

Conforme descrito no eq.3, o superóxido só sofrerá dismutação espontânea na presença de H^+ , portanto, seu tempo de vida é marcadamente pH dependente.

A formação de O_2^- ocorre em todos os organismos na presença de oxigênio. Organismos aeróbios possuem desta forma a enzima superóxido dismutase (SOD), que provê a defesa contra este radical. O O_2^- , conforme descrito no esquema 3, sofre dismutação espontânea, sendo convertido a peróxido de hidrogênio, porém, esta reação ocorre de forma mais rápida na presença da superóxido dismutase. A velocidade de reação do O_2^- com a SOD em pH neutro é da ordem de $2 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que, para a reação de dismutação espontânea entre duas moléculas de O_2^- , a velocidade de reação é de $2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Em microorganismos, a SOD encontra-se na forma de MnSOD, sendo esta forma, também encontrada na matriz mitocondrial de células eucariotas. Em alguns microorganismos, como *Escherichia coli* (*E. coli*) desenvolvida em ambiente anaeróbio, a presença de FeSOD pode ser identificada. A CuZnSOD encontra-se no citoplasma de células eucariotas, no periplasma de bactérias Gram-negativas e no espaço extracelular de mamíferos.

A reação da CuZnSOD com o O_2^- pode ser descrita esquematicamente como :

Portanto, além da possibilidade de reagir com biomoléculas, fundamentais ao funcionamento celular, a toxicidade do O_2^- pode advir do produto de sua desativação. Tanto a dismutação espontânea, quanto à ação da SOD resultam na formação de peróxido de hidrogênio.

3.2.2 - PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio é um dos mais versáteis oxidantes e através de catálise, o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio pode atuar tanto como agente oxidante como redutor. Apesar de seu poder de reação, o peróxido de hidrogênio é um metabólito natural em muitos organismos e, quando decomposto, resulta em oxigênio molecular e água com liberação de calor³⁷.

O H_2O_2 pode promover danos diretos em DNA, através de mecanismos de sinalização intracelular, que levam à degradação da cromatina. Acredita-se que

este processo possa estar envolvido no potencial mutagênico, associado ao peróxido de hidrogênio em células sobreviventes³⁸. A adição de H_2O_2 exógeno, ou sua produção intracelular, em resposta a estímulos externos, afeta a função de várias proteínas, incluindo quinases, fosfatases, fosfolipases e os canais de íons. Durante a exposição ao H_2O_2 , muitas proteínas com metais ligantes são susceptíveis a dano oxidativo e a liberação de íons metálicos³⁹. A reação do H_2O_2 com heme proteínas como o citocromo c, produz compostos capazes de oxidar biomoléculas e iniciar a peroxidação lipídica, que provoca danos à membrana celular.

O H_2O_2 na presença de mieloperoxidases pode reagir com íons cloro produzindo ácido hipocloroso (HOCl), considerado um potente agente bactericida^{34,40}.

Desta forma, o H_2O_2 , uma molécula pequena e difusível, pode ser rapidamente sintetizada e destruída, sendo considerada, importante mensageiro intracelular quando encontrado em concentrações não tóxicas⁴¹.

As enzimas responsáveis pela desativação do H_2O_2 são as catalases e as peroxidases. A catalase dismuta o H_2O_2 em $O_2 + H_2O$ e as peroxidases utilizam agentes redutores para reduzir o H_2O_2 a $2H_2O$. As catalases e as peroxidases constituem famílias de diversas enzimas, sendo a maioria heme enzimas.

Em mamíferos, as catalases podem agir como peroxidases e são mais eficientes frente a grandes quantidades de H_2O_2 . Na *E. coli* existem dois tipos de catalases chamadas hidroperoxidases (HP) I e II. A HP-I é induzida em resposta à presença de H_2O_2 , enquanto a HP-II é induzida pela entrada da célula em fase estacionária de crescimento, sendo que a HP-I está associada à membrana citoplasmática, enquanto a HP-2 encontra-se no citoplasma.

As peroxidases são encontradas em fungos (citocromo *c* peroxidase), a *E. coli* produz NADPH peroxidase e em mamíferos, a principal peroxidase é a glutathione peroxidase .

Apesar de isoladamente, o H_2O_2 ser considerado um agente deletério para a célula, sua toxicidade, pode ainda ser decorrente da reação ocorrida entre o H_2O_2 e o O_2^- , conhecida como reação de Haber-Weiss, e da reação entre o H_2O_2 e o Fe^{2+} , conhecida como reação de Fenton .

A reação de Haber-Weiss pode ser representada como:

A reação de Fenton é representada por:

sendo que, o Fe^{2+} pode ser substituído por Cu^{2+} .

O O_2^- pode ainda, reagir com o Fe^{3+} , formando O_2 e Fe^{2+} . Portanto, pequenas quantidades de Fe^{2+} , podem catalisar a formação de grandes quantidades de radical hidroxila na presença de H_2O_2 e O_2^- .

3.2.3 - RADICAL HIDROXILA

O radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) é um oxidante extremamente poderoso que ataca a maioria dos compostos orgânicos e possui, devido à sua reatividade, um pequeno poder de difusão. O $\text{OH}\cdot$ reage virtualmente com qualquer molécula, causando danos extremos e indiscriminados à célula⁴² .

O $\text{OH}^\cdot$ é formado a partir das reações de Haber-Weiss e Fenton. Recentes evidências apontam para a formação deste radical subsequente à formação de oxigênio singleto^{43,44, 45}.

Ao contrário do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila não pode ser desativado enzimaticamente e, conforme acima mencionado, devido à sua alta reatividade, o $\text{OH}^\cdot$ reage com qualquer composto oxidável disponível ao seu redor. A única forma de proteção contra este radical é a desativação do mesmo por substâncias antioxidantes.

Quando formado nas proximidades da membrana celular, o radical hidroxila captura um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado da membrana fosfolipídica e se transforma em água. O ácido graxo danificado, em presença de oxigênio, transforma-se em um radical livre e dá início a uma reação em cadeia que irá destruir a membrana celular. Este processo é chamado de peroxidação de lipídios. Danificada, a membrana perde sua flexibilidade e suas funções de barreira levando ao aumento da permeabilidade celular com conseqüente desequilíbrio iônico na célula⁴⁶. A reação em cadeia da peroxidação lipídica pode ser quebrada pela ação de agentes antioxidantes como α -tocoferol (vitamina E), ascorbato e ácido úrico^{47, 48}.

Os danos causados pela radiação ionizante ao DNA são associados em grande parte à ação do $\text{OH}^\cdot$ ⁴⁹, que apresenta alta reatividade para reações de abstração de H⁵⁰. Esta reação específica do $\text{OH}^\cdot$ com o DNA pode ser creditada, em parte, às suas características de alta eletrofilicidade, alta reatividade termocinética e a um mecanismo de produção próximo ao DNA.

3.2.4 - OXIGÊNIO SINGLETO

O oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) representa um estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular. Ele é produzido nas células tanto em condições fisiológicas, quanto em condições fisiopatológicas.⁵¹

O $^1\text{O}_2$ é extremamente reativo e pode danificar sistemas biológicos através da oxidação de macromoléculas, incluindo lipídios, ácido nucléico e proteínas .

O oxigênio singleto, dentro dos princípios da PDT, é formado através da transferência de energia do estado tripleto do fotossensibilizador para o oxigênio molecular, levando à reação tipo II, creditada por alguns autores, como a maior responsável pelo efeito fotodinâmico^{29,51}. A energia de excitação do estado tripleto do fotossensibilizador deve exceder 0.98eV, que é a energia necessária para excitação do $^3\text{O}_2$ a $^1\text{O}_2$.

Acredita-se que, a maioria dos fotossensibilizadores utilizados em PDT, atue através da formação de $^1\text{O}_2$ ^{5, 52}. A produção de $^1\text{O}_2$ tem sido utilizada como medida de eficiência fotodinâmica, bem como, para cálculos de dosimetria direta, que visam prever os resultados da terapia através da monitoração da formação desta ERO .

O $^1\text{O}_2$ é a única ERO representada por um estado eletronicamente excitado. As diferenças entre o $^1\text{O}_2$ e as demais ERO são seu tempo de vida e sua forma de desativação. O $^1\text{O}_2$ pode existir como um estado excitado por um determinado período de tempo, antes de retornar ao estado fundamental, através da transferência de sua energia, para modos vibracionais do solvente. Ao retornar ao estado fundamental, ele automaticamente perde sua reatividade. Em contraste, às outras ERO, retêm sua reatividade até reagirem com outras moléculas , portanto, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é limitado mesmo em um sistema

livre de reagentes. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ varia de acordo com o solvente e é de aproximadamente 3 μs em água.

Devido ao potencial de reação do $^1\text{O}_2$ com proteínas, encontradas em abundância em meios biológicos, como triptofano, tirosina, histidina e cisteína que consomem aproximadamente 68% do $^1\text{O}_2$ formado, seu tempo de vida em meios biológicos é fortemente reduzido^{27,53}. Porém, recentes evidências apontam para a possibilidade de difusão do $^1\text{O}_2$ intracelular⁵⁴. Skovsen e colaboradores reportam que uma vez formado no núcleo da célula, o $^1\text{O}_2$ poderia percorrer uma distância aproximada de 268nm, portanto a localização subcelular da formação desta ERO também pode influenciar seu tempo de vida em um substrato biológico.

O $^1\text{O}_2$ pode ser formado ainda através da reação do ácido hipocloroso (HOCl) com peróxido de hidrogênio⁵⁵. Conforme descrito anteriormente o HOCl é um potente agente bactericida e pode ser gerado através da reação do H_2O_2 catalizada por mieloperoxidases na presença de Cl^- ^{34,40}. O $^1\text{O}_2$ pode ainda ser formado através da reação do HOCl com hidroperoxidases. As hidroperoxidases lipídicas são o produto principal da peroxidação lipídica de membranas celulares.

A desativação do $^1\text{O}_2$ em meios biológicos somente poderá ocorrer através da reação com substâncias antioxidantes como, por exemplo, o beta-caroteno, que ao absorver a energia do $^1\text{O}_2$, retorna ao estado fundamental por emissão de calor.

Portanto, a formação e ação das ERO parecem ser processos cíclicos, onde a desativação de uma espécie leva a formação de outra, até que o estresse oxidativo esteja instaurado. A morte ou a sobrevivência celular depende, sobretudo, da capacidade antioxidante do ambiente, das defesas celulares responsáveis pela neutralização das ERO e da capacidade de reparo celular.

3.3 – ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS RELACIONADOS À PDT ANTIMICROBIANA.

A PDT antimicrobiana tem como alvo microorganismos procariontes, eucariontes e vírus. Devido às características peculiares de cada um destes microorganismos e ao escopo deste estudo, este ítem aborda os aspectos relevantes de microorganismos procariontes no contexto da PDT antimicrobiana.

As bactérias são seres microscópicos com cerca de 0,2 a 1,5µm de diâmetro e 1 a 6 µm de comprimento⁵⁶, porém, podem chegar até 10µm de diâmetro e 25µm de comprimento. O tamanho, a forma e o arranjo das bactérias constituem sua macromorfologia. As estruturas celulares internas, diferenciam estes microorganismos quanto às necessidades nutricionais, resistência às alterações ambientais e regulação de metabolismo ⁵⁷.

A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Ela é constituída por ácido diaminopimérico, ácido murânico e ácido teicóico além de aminoácidos, carboidratos e lipídios. Todos esses compostos formam substâncias poliméricas complexas que, por sua vez estruturam a parede celular. A estrutura rígida da parede é devida à presença de peptideoglicano, também chamado de mucopeptídeo ou mureína. Além da função de arcabouço celular, a parede tem também a função de manter a pressão osmótica intrabacteriana impedindo o rompimento da célula .

A divisão das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua resposta à coloração de Gram, é decorrente das diferenças na composição e estrutura da parede celular. As bactérias classificadas como Gram-positivas possuem na composição de sua parede proteínas, lipídios, peptideoglicano e ácidos teicóicos. As bactérias Gram-positivas, possuem maior

quantidade de peptideoglicano na parede celular e esta diferença estrutural aumenta a espessura e a rigidez da parede celular .

As bactérias classificadas como Gram-negativas apresentam parede celular menos espessa, porém mais complexa do que as Gram-positivas. A maior complexidade é devida à presença de uma membrana externa que cobre a camada de peptideoglicano. A membrana externa é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPSs). Os LPSs estão localizados exclusivamente na camada externa da membrana, enquanto que os fosfolipídios estão presentes quase que somente na camada interna .

A membrana citoplasmática das bactérias tem espessura de aproximadamente 10nm e separa a parede celular do citoplasma. É constituída principalmente de lipídios e proteínas, desempenhando importante papel na permeabilidade seletiva da célula. Ela difere da membrana citoplasmática das células eucarióticas por não apresentar esteróides em sua composição, além de, apresentar várias enzimas do metabolismo respiratório, que apresentam função semelhante às cristas mitocondriais. A FIG. 3 apresenta um esquema do revestimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Figura 3 – Esquema representativo da membrana de bactérias Gram-positivas (A) e bactérias Gram-negativas (B).⁵⁸

A área citoplasmática das bactérias é composta por água, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios e íons inorgânicos. Os ribossomos estão presentes em grande número nas células bacterianas conferindo ao citoplasma aparência granular quando observado ao microscópio eletrônico .

As bactérias apresentam um cromossomo circular constituído por uma única molécula de DNA não delimitado por membrana nuclear. O cromossomo bacteriano contém todas as informações necessárias à sobrevivência da célula e é capaz de autoduplicação ^{56, 57}.

As ERO podem atuar em diferentes componentes celulares, usualmente por sua alta reatividade as ERO atuam sobre o componente mais próximo. Os danos causados em microorganismos podem ser intercalação do fotossensibilizador com DNA e posterior oxidação da base guanina, peroxidação de lipídeos das membranas plasmáticas, inibição da síntese de proteínas por danos a estruturas celulares. Todos estes danos são causados pela oxidação ou redução dos componentes celulares, ou pela formação de espécies radicalares⁵⁹.

A efetividade da PDT antimicrobiana é marcadamente dependente da composição do revestimento bacteriano. De forma geral, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a ação da PDT do que as bactérias Gram-negativas^{5, 11, 14}. O papel da membrana externa presente no revestimento das bactérias Gram-negativas tem sido objeto de estudo e evidências apontam para sua importância na resistência destes microorganismos contra fatores de defesas humorais e na resistência antimicrobiana⁶⁰.

A membrana externa é altamente permeável para solutos hidrofílicos e portanto pouco permeável a solutos lipofílicos. Os LPSs e os canais de porina presentes na membrana externa possuem a função de barreira, permitindo uma eficiente e seletiva difusão de nutrientes para o espaço intracelular .

A adição de AM e AT a uma suspensão contendo bactérias, leva a agregação do corante através da formação de dímeros ligados a biopolímeros presentes na superfície bacteriana. Usacheva e colaboradores⁶¹ demonstraram a reação do AM e do AT na presença de LPSs derivados de quatro diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. A presença de LPSs leva a reações metacromáticas nos corantes, resultando na formação de dímeros de AM e de agregados maiores para o AT. A alteração promovida nos corantes pela presença de LPSs da membrana externa, pode ser um dos fatores responsáveis pela menor eficiência da PDT antimicrobiana contra estes microorganismos.

Além da presença de LPSs na membrana externa, os microorganismos Gram-negativos apresentam maior quantidade de glutathione (GSH) do que os Gram-positivos. Em média, os microorganismos Gram-positivos apresentam $0,5\mu\text{mol/g}$ com a maior quantidade tendo sido reportada para *Streptococcus lactis* ($4,6 \pm 0,4\mu\text{mol/g}$) e os Gram-negativos apresentam média de $6,23\mu\text{mol/g}$ com a maior quantidade observada em *E. coli* de crescimento aeróbio ($27 \pm 2\mu\text{mol/g}$).⁶² A GSH e sua forma oxidada (GSSG) são responsáveis pelo equilíbrio redox intracelular, sendo que em condições de estresse oxidativo, a GSH pode desativar, através de seu potencial de redução enzimática, o H_2O_2 , e reage não enzimaticamente com outras ERO, como oxigênio singleto, radical superóxido e radical hidroxila. Além desta capacidade antioxidante, a GSH pode regenerar outro agente antioxidante, o ácido ascórbico, através do ciclo ascorbato-glutathione⁶³.

No contexto de defesa contra ERO, a *E. coli*, como exemplo de microorganismo Gram-negativo, possui três diferentes superóxido dismutases codificadas por *sodA*, *sodB*, *sodC*, que metabolizam O_2^- . *SodA* codifica a Mn-SOD presente no citoplasma da célula, *sodB* codifica a Fe-SOD encontrada durante o metabolismo basal normal e *sodC* codifica a Cu-Zn-SOD no periplasma, que lida com a produção de O_2^- extracelular e na membrana celular. Além deste sistema, a *E. coli* possui ainda, como defesa contra ERO duas catalases: a hidroperoxidase I (HPI) e a hidroperoxidase II (HPII), envolvidas na eliminação de H_2O_2 intracelular.

A HPI é presente durante o crescimento aeróbio, e a HPII é induzida durante a fase estacionária de crescimento celular⁶⁴. Portanto, além das características intrínsecas do microorganismo, sua fase de crescimento celular e a formação de ecossistemas organizados *in vivo* podem também dificultar a ação da PDT.

As bactérias apresentam, em meios de cultura líquidos, quatro fases características de desenvolvimento. A fase inicial chamada de fase lag é um período caracterizado por crescimento lento, durante o qual o microorganismo está se adaptando às condições do meio. Esta fase é seguida pela fase chamada de log ou fase exponencial, na qual o crescimento bacteriano é exponencial, resultando na duplicação da população microbiana a cada ciclo de replicação. Uma peculiaridade interessante do crescimento exponencial bacteriano é que o processo de envelhecimento não é detectado entre células de uma mesma população. A razão para este fato é que o processo de fissão binária ocorre de forma simétrica com dispersão não conservativa tanto de constituintes celulares íntegros quanto dos danificados. A fase seguinte é conhecida como fase estacionária, que se inicia com a limitação de nutrientes disponíveis no meio de cultura e a taxa de replicação iguala-se à taxa de inviabilidade celular. A quarta fase, conhecida como fase de declínio logarítmico, ocorre quando a taxa de morte celular é maior do que a de replicação. Esta fase ocorre em períodos de tempo superiores ao das fases anteriores⁶⁵.

A fase de crescimento bacteriano pode interferir no processo de fotossensibilização letal através de, por exemplo, aumento das defesas intracelulares contra ERO. *E. coli*, em fase estacionária de crescimento, apresenta aumento dos níveis de proteínas antioxidantes e, nesta fase de crescimento, a população bacteriana torna-se mais resistente ao estresse oxidativo externo^{65,66}. Além do aumento do nível de antioxidantes intracelulares, durante a fase estacionária de crescimento, algumas bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, apresentam aumento da membrana externa resultando em aumento do periplasma.

É provável que o efeito do processo fotodinâmico dependa do grau de ligação entre fotossensibilizador e célula-alvo, uma vez que as ERO possuem alta reatividade e portanto limitado poder de difusão ⁶⁷.

A formação de uma população de microorganismos sobre uma superfície envolta por matriz extracelular é conhecida como biofilme. A matriz extracelular que envolve o biofilme promove restrita difusão de substâncias e dificulta a ligação de antimicrobianos com os microorganismos. Estes fatores são considerados de extrema importância para a explicação da resistência microbiana em biofilmes⁶⁸. Outros fatores apontados como importantes seriam a baixa taxa de crescimento celular e a expressão gênica de resistência biofilme-específica.

As ERO formadas via processo fotodinâmico reagem com biomoléculas não celulares como as observadas na matriz extracelular do biofilme. Desta forma os LPS da matriz são afetados pela PDT, quebrando-se assim, a integridade do sistema permitindo então a entrada de fotossensibilizador na matriz e a conseqüente ação sobre a população celular. Gad e colaboradores demonstraram o potencial da PDT com corantes catiônicos em promover efetiva fotossensibilização letal mesmo na presença de matriz extracelular.

3.4 – TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA: FOTOSSENSIBILIZADORES FENOTIAZÍNICOS E FONTES DE IRRADIAÇÃO.

Os corantes AM e AT são compostos fenotiazínicos de cor azul com absorção máxima na região do vermelho visível ($\cong \lambda=660\text{nm}$ e 630nm respectivamente). Eles são compostos por um esqueleto tricíclico simples, sendo que, seu tamanho e forma linear, os tornam ideais para intercalação com ácidos nucleicos. Tanto o AM quanto o AT são compostos utilizados como corantes vitais e em histologia. O primeiro relato da ação fotodinâmica do AM contra bacteriófagos e vírus foi publicado em 1928 ⁶⁹. O ANEXO A apresenta a representação molecular do AM e do AT.

Estes compostos são comercializados normalmente na forma de sais com o cromóforo do corante sendo catiônico. Em solução, os dois corantes são hidrofílicos ($\log P < 1$) (ANEXO A); porém, em sistemas biológicos, o AT é parcialmente convertido a sua forma neutra devido à desprotonação; já o AM é reduzido a leuco-AM pelas coenzimas NADH e FADH, portanto, ambos corantes estão sujeitos à redução metabólica, resultando na formação de espécies neutras. A forma neutra é lipofílica ($\log P > 1$), sendo que este comportamento não é aparente através da mensuração típica do $\log P$ em água e octanol.

Estes dois compostos apresentam estrutura química e propriedades físico-químicas semelhantes. Apesar das propriedades semelhantes, a eficiência fotodinâmica destes compostos, varia entre diferentes microorganismos. O AM possui maior efetividade contra vírus, enquanto que o AT parece ser mais eficaz contra alguns tipos de bactérias e contra esporos bacterianos⁷⁰. Na comparação direta entre estes compostos para erradicação de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenza*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, representando espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, com diferentes coeficientes de permeabilidade de membrana, o AT foi considerado mais tóxico tanto na presença como na ausência de radiação. Porém, estes resultados diferem entre os diversos trabalhos. Usacheva e colaboradores reportam maior efetividade do AM do que do AT para inativação de *S. aureus* ATCC:6538. Wainwright e colaboradores⁷¹ demonstraram a mesma atividade antimicrobiana do AM e do AT contra *S. aureus* NCTC 6571. Wilson e colaboradores demonstraram que o AM é mais eficiente para a erradicação de *Fusobacterium nucleatum*⁷².

Diversos fatores podem contribuir para as diferenças reportadas. Como citado anteriormente, as defesas antioxidantes de cada microorganismo, a localização subcelular do composto e sua interação com o meio poderiam explicar as diferenças reportadas.

A diferença mais significativa entre estes dois corantes é o coeficiente de partição P (ANEXO A), que é aproximadamente 3 vezes mais alto para o AT. Esta característica deve permitir maior permeabilidade e acúmulo de moléculas de AT em regiões hidrofóbicas da membrana celular. É necessário portanto, o conhecimento do comportamento dos fotossensibilizadores em diferentes substratos pois, este comportamento, está intimamente ligado com o coeficiente de partição. Este conhecimento deve estar centrado principalmente em solução aquosa e nos diversos lipídios presentes em meios biológicos.

Tanto o AM quanto o AT são corantes metacromáticos. Em situações como aumento da concentração, presença de polímeros aniônicos ou sais inorgânicos, seus espectros de absorção mudam devido a alterações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas de corante e as moléculas adjacentes. Esta interação resulta na agregação do corante que, em alguns casos, fica restrita à dimerização.

A dimerização torna-se mais evidente pela análise do efeito metacromático observado através da interação do AM e AT com LPSs, que resulta num declínio do pico de absorção máxima com aumento do pico de absorção característico de dímeros em menores comprimentos de onda. Como a mudança nos picos de absorção ocorre em direção a menores comprimentos de onda, este efeito é conhecido como hipsocrômico. No efeito batocrômico, a mudança ocorre para maiores comprimentos de onda⁷³.

Usacheva e colaboradores reportam maior efeito metacromático para o AT do que para o AM e, de acordo com esses autores, o efeito dos dímeros pode ser mais relevante para a ação fotodinâmica do que o de espécies monoméricas, apesar, das propriedades fotofísicas e fotoquímicas das moléculas serem analisadas usualmente nas formas não agregadas. Segundo os autores, o AT não só apresentou maior efeito metacromático como também maior eficiência fotodinâmica, o que levou à hipótese da interação com LPSs da membrana ser

importante fator para obtenção da inativação de microorganismos. Para testar esta hipótese, em trabalho subsequente, os autores utilizaram o íon Ca^{2+} como competidor da ligação entre fotossensibilizador e LPSs da membrana celular. Neste modelo experimental, o íon Ca^{2+} competiria com cromóforos catiônicos como o AM e o AT na ligação com LPSs e, portanto, afetaria a efetividade de ambos como antimicrobianos⁷⁴.

Os resultados demonstraram que o Ca^{2+} substitui moléculas de corante ligadas à membrana. A utilização de cloreto de cálcio em concentrações crescentes levou à desagregação dos corantes, observada através de alterações espectroscópicas com formação de agregados cada vez menores e predominância de monômeros na presença de altas concentrações de CaCl_2 , mesmo em soluções contendo LPSs. Quanto à eficiência fotodinâmica, os autores observaram que a adição de CaCl_2 inibiu a fotossensibilização para todas as bactérias testadas. A sobrevivência celular aumentou com o aumento da concentração de CaCl_2 . Uma vez que o AT apresentou maior interação com LPSs do que o AM, seria esperado que a ação fotodinâmica do AT fosse inibida em maior grau pela presença de Ca^{2+} , porém, os resultados demonstraram que o AM foi mais afetado do que o AT levantando a hipótese da competição do Ca^{2+} por sítios de ligação em proteínas da membrana.

As porinas presentes na membrana de Gram-negativos contêm aminoácidos com carga, os quais, através de seu número e posição, determinam a seletividade iônica para entrada na célula. Porinas com seletividade para cátions podem atrair moléculas de AM e de AT, facilitando a passagem dos corantes através da membrana celular. Uma vez que as proteínas são hidrofílicas, a atração de AM é aumentada, devido a maior hidrofiliidade deste composto quando comparado ao AT. Este fato explica os diferentes sítios de ação destes compostos frente a *E. coli*. O AT age em membrana celular, enquanto o AM atuaria sobre ácidos nucléicos.

O papel de monômeros e dímeros na fotossensibilização letal não é claro, porém, seus comprimentos de onda de absorção máxima são diferentes. Para o AM, o comprimento de onda de absorção máxima para monômeros se encontra em aproximadamente $\lambda=660\text{nm}$, enquanto que o de dímeros se encontra em $\lambda=610\text{nm}$. Para o AT, o comprimento de onda de absorção máxima para monômeros é de aproximadamente $\lambda=630\text{nm}$, enquanto que o de dímeros localiza-se em $\lambda=590\text{nm}$. Alterando-se o comprimento de onda da fonte de irradiação, observa-se que ambas as espécies podem ser efetivas para a inativação microbiana¹⁴. Na presença de maior quantidade de agregados, a irradiação de dímeros produz efeito igual à irradiação de monômeros o que comprova o envolvimento de ambas espécies no processo de sensibilização. Conforme descrito anteriormente, o oxigênio singlete, é considerado de fundamental importância no processo de fotossensibilização^{5,52}. A fotoquímica de monômeros de AM apresenta predominância para formação de oxigênio singlete; já os dímeros apresentam maior rendimento para reações do tipo I, envolvendo transferências eletrônicas. Portanto, os dois tipos de reação poderiam ser igualmente importantes para o processo fotodinâmico.

Uma vez que, o comprimento de onda de absorção máxima, para estes compostos fenotiazínicos, se altera devido à presença de agregados, as fontes de irradiação poderiam apresentar papel fundamental no processo fotodinâmico.

Diversas fontes de irradiação são utilizadas para PDT⁷⁵. Lâmpadas de xenônio apresentam resultados semelhantes aos obtidos com fontes laser para eliminação de microorganismos periodontopatogênicos utilizando-se AT⁷⁶.

Chan e Lai⁷⁷ reportaram o efeito de diferentes comprimentos de onda ($\lambda=632,8\text{nm}$, $\lambda=665\text{nm}$ e $\lambda=830\text{nm}$) utilizando fontes laser para erradicação de patógenos periodontais utilizando AM. Nesse estudo, os melhores resultados foram para um laser com $\lambda=665\text{nm}$, o que seria de se esperar uma vez que este comprimento de onda corresponde ao comprimento de onda de absorção máxi

do AM. O fato do laser em $\lambda=830\text{nm}$ ter produzido algum efeito pode estar relacionado à presença de bactérias que possuem pigmentos negros, como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromonas gingivalis*.

Além do espectro de emissão da fonte de irradiação os parâmetros de irradiação utilizados variam largamente entre os estudos. Wainwright e colaboradores utilizaram fonte de luz de $1,7 \text{ mWcm}^{-2}$ por uma-hora para excitação de compostos fenotiazínicos. Souza e colaboradores utilizaram laser de 30mW, com comprimento de onda de $\lambda=685\text{nm}$, para ativação de AM durante 5 minutos. Em ambos estudos, uma resposta satisfatória foi reportada. DeSimone e colaboradores⁷⁸ utilizaram laser de HeNe ($\lambda=632,8\text{nm}$) 0,95mW e de InGaAlPO₄ ($\lambda=670\text{nm}$) com 5mW, por 30s, 60s e 120s para ativação de AT contra duas espécies bacterianas, uma Gram-positiva e outra Gram-negativa. O desempenho do laser de HeNe, mesmo apresentando o comprimento de onda mais ressonante com a absorção do Ps ($\cong 630\text{nm}$) foi pior do que o do laser de InGaAlPO₄, demonstrando a importância dos parâmetros de irradiação.

O fracionamento da entrega de energia tem sido proposto para evitar-se a fotodegradação da droga. Metcalff e colaboradores⁷⁹ utilizaram fonte de luz branca durante 5min contínuos ou 5min divididos em frações de 1min com intervalo de 5min entre as aplicações ou frações de 30s com intervalo de 2 min entre as aplicações, usando eritrosina como fotossensibilizador. Os autores observaram que o fracionamento resultou em maior taxa de inativação sendo que o fracionamento de 10X30s levou ao melhor resultado.

Em PDT oncológica, devido à oxigenação do tecido e a fotodegradação das drogas, baixas irradiâncias têm sido recomendadas^{24,80,81}. Porém, para a aplicação da PDT com finalidade antimicrobiana com compostos fenotiazínicos, as formas de irradiação não apresentam um consenso em relação aos parâmetros exposição radiante e irradiância.

4 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Fotossensibilizadores: Os corantes AT (azul de orto-toluidina) (90%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e AM (87%, Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA) foram utilizados sem purificação adicional em todos os ensaios efetuados.

4.1 - Estudo dos solventes em relação à presença de oxigênio dissolvido e pH.

Após análise da literatura relativa ao uso de AT e AM com finalidade antimicrobiana, os solventes utilizados com maior frequência para dissolução do corante foram selecionados^{1,6,11,84}: água deionizada (Biodinâmica, Ibiporã, Br) água destilada (Biodinâmica, Ibiporã, Br), água estéril (Equiplex, São Paulo, Br), solução salina 0,9% (Biodinâmica, Ibiporã, Br) e solução salina 0,45% preparada através da dissolução de solução salina 0,9% em igual volume de água estéril. Foram excluídos do ensaio de solventes a solução salina tamponada com fosfato (PBS)^{1,7} e meios de cultura bacteriana^{82,83} utilizados como solventes em alguns estudos, mas que não apresentam relevância prática para a aplicação da terapia *in vivo*.

Os solventes 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 (22°C). 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 (partes por milhão) foram registrados. As medidas foram registradas em três dias distintos para correção de possíveis alterações promovidas por variação de temperatura, uma vez que, a quantidade de O₂ dissolvido é sensível à altitude,

salinidade e temperatura. Os solventes tiveram seu pH medido (pH-1700, Instrutherm, São Paulo, Brasil) antes e após a mistura com os corantes.

Os resultados obtidos em relação ao oxigênio dissolvido foram analisados estatisticamente através do teste-t de *Student*, sendo considerados significantes com nível de incerteza de 5% ($p < 0,05$).

4.2 - Efeito da concentração e solvente na agregação do corante.

Dez-mg de corante foram dissolvidos no volume apropriado de solvente para obtenção das concentrações de 1mg/mL ($\approx 3\text{mM}$), 500 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 1,5\text{mM}$), 250 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 750\mu\text{M}$), 100 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 300\mu\text{M}$), 50 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 150\mu\text{M}$), 20 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 60\mu\text{M}$), 10 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 30\mu\text{M}$) e 5 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 15\mu\text{M}$).

Foram utilizados cinco solventes (água deionizada, água destilada, água estéril, solução salina 0,9% e solução salina 0,45%) e dois corantes testados em 8 concentrações resultando em 80 combinações possíveis.

Todos os ensaios de absorção foram realizados em espectrofotômetro de absorção óptica ($\lambda = 190\text{nm}$ - 2500nm) de duplo feixe (Cary -17D Spectrophotometer Conversion, On-line Instrument System Inc, EUA), interfaceado por um microcomputador, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,1cm e 1cm.

As varreduras foram realizadas de $\lambda = 200\text{nm}$ a $\lambda = 700\text{nm}$. As referências iniciais foram realizadas com os solventes apropriados para cada ensaio. Os espectros de absorção foram registrados imediatamente após a diluição do corante no solvente através de agitação em agitador elétrico por 20s. 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 $\lambda = 800\text{nm}$.

Os espectros obtidos foram analisados utilizando-se *software* apropriado (Origin 6.0- Microcal Software Inc, Northampton, EUA). Foi realizada a análise do espectro de absorção, bem como a relação entre a absorção máxima de dímeros em relação a monômeros AD/AM ¹⁴, representada pela fórmula para o AM: $R[\frac{AD}{AM}] = \frac{DO_{610nm}}{DO_{660nm}}$, e para o AT $R[\frac{AD}{AM}] = \frac{DO_{590nm}}{DO_{630nm}}$, onde $R[\frac{AD}{AM}]$ é a razão entre a densidade ótica da absorção de dímeros e a densidade ótica da absorção de monômeros, $\frac{DO_{610nm}}{DO_{660nm}}$ e $\frac{DO_{590nm}}{DO_{630nm}}$ é a razão das densidades óticas, obtidas a partir dos espectros de absorção, nos comprimentos de onda de $\lambda=610nm$ e $\lambda=660nm$ para o AM e de $\lambda=590nm$ e $\lambda=630nm$ para o AT.

Para ensaio do efeito de fluídos orgânicos sobre a agregação do corante, foram utilizados o soro de sangue e a saliva, adicionados às concentrações de 100µg/mL e 10µg/mL.

Um-mg de corante foi dissolvido no volume apropriado de solvente para obtenção das concentrações de 200µg/mL e 20µg/mL. Um-mL de cada solução foi retirado e adicionado a 1mL de saliva recém-coletada de doadores saudáveis, para se obter uma mistura contendo 100µg/mL e 10µg/mL de corante dissolvidos em saliva e no solvente eleito. A mistura foi homogeneizada em agitador elétrico por 20 s. Os espectros de absorção foram registrados imediatamente após a mistura⁸⁴, bem como 1 e 5 min após a combinação. Os espectros obtidos foram comparados aos espectros das respectivas concentrações em solução contendo somente solvente e através da razão $\frac{AD}{AM}$, conforme supra-mencionado.

Para análise do efeito do soro de sangue a mesma metodologia foi utilizada substituindo-se a saliva por 1mL de soro de sangue de cavalo (Sigma, St Louis, Missouri, EUA). Os espectros foram obtidos imediatamente após a homogeneização.

4.3 - Efeito da temperatura sobre a agregação do corante.

Dez-mg de corante foram dissolvidos no volume apropriado de água deionizada e solução salina para obtenção das concentrações de 250µg/mL, 100µg/mL, e 10µg/mL.

As soluções foram analisadas espectroscopicamente à temperatura ambiente (22°C) e seus respectivos espectros de absorção foram registrados. Em seguida as soluções foram aquecidas em banho térmico tendo sua temperatura monitorada até alcançar a marca de 37°C. Ao atingir a temperatura desejada, a amostra era imediatamente levada ao espectrofotômetro.

As varreduras foram realizadas de $\lambda=200\text{nm}$ a $\lambda=700\text{nm}$. Nos espectros obtidos foi realizada a análise dos picos de absorção máxima, bem como a relação entre a absorção do pico de dímeros e monômeros.

4.4 – Efeito de parâmetros físicos da radiação sobre a fotodegradação.

Para a irradiação dos corantes foram selecionadas duas fontes de irradiação, cada qual com comprimento de onda coincidindo com os picos de absorção máxima de cada fotossensibilizador. Para o AM foi utilizado laser de diodo $\lambda=660\text{nm}$ ($\pm 2\text{nm}$) (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), com potência máxima de 40mW regulável de 10 em 10mW e área do feixe de $0,04\text{ cm}^2$ (informação do fabricante). A potência do laser foi aferida antes de cada irradiação com medidor de potência calibrado (LaserCheck- Coherent, EUA).

Para a irradiação do AT foi desenvolvido um LED (*light- emitting diode*), com emissão centrada em $\lambda=645\text{nm}$ ($\pm 10\text{nm}$) (Protótipo LED 630, MMOptics, São

Carlos, Brasil), com potência regulável de 10mW em 10mW e área do feixe de $0,05\text{cm}^2$ (Informação do fabricante).

O LED foi caracterizado tendo sua potência total registrada em um medidor de potência calibrado (Scientech 373, Boulder Corp, EUA). Após o registro da potência total emitida, o espectro de emissão do LED foi registrado (Acton Spectro PRO 2500, Princeton Instruments, EUA) com varredura efetuada de $\lambda=500\text{nm}$ a $\lambda=700\text{nm}$. Foi realizado o cálculo da potência para cada faixa espectral de emissão do LED.

Para realização das irradiações, duas seqüências de testes foram efetuadas. Na primeira seqüência, a potência do equipamento era mantida constante e foi variado o tempo de exposição. Os tempos de exposição escolhidos foram de 1, 2, 3, 4 e 5 min.

Na segunda seqüência, a potência do equipamento foi variada para se obter a relação com irradiância. Foram utilizadas as potências de 10mW, 20mW, 30mW e 40mW para o equipamento laser e LED. A TAB. 1 representa a seqüência de ensaios estudados.

As irradiações foram realizadas diretamente em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1cm e tampa. Uma máscara de acrílico foi confeccionada para garantir a coincidência entre os pontos de irradiação e os pontos de leitura das amostras no espectrofotômetro.

As amostras recém-preparadas eram colocadas em um suporte que além de posicionar a amostra, mantinha as ponteiras do LED ou do laser em posição fixa sobre o ponto de irradiação. A FIG. 4 ilustra o método de irradiação das amostras.

As irradiações prosseguiram pelo tempo determinado pelo ensaio desejado e imediatamente após a irradiação as amostras eram colocadas no espectrofotômetro para realização da varredura. As leituras foram feitas de $\lambda=200\text{nm}$ a $\lambda=700\text{nm}$ e analisadas em *software* apropriado.

Foi avaliada nos espectros de absorção a razão AD/AM . Foi avaliada também a razão dos picos de absorção máxima na região do ultravioleta, representada pela fórmula: $R_{uv} = DO_{240nm} / DO_{290nm}$, onde R_{uv} , é a razão dos picos de absorção máxima no ultravioleta, DO_{240nm} é a densidade óptica em $\lambda=240\text{nm}$ e DO_{290nm} é a densidade óptica em $\lambda=290\text{nm}$, obtidas através dos espectros de absorção.

Figura 4 – Dispositivo utilizado para a irradiação das amostras.

Tabela 1 – Sequência de testes realizados para análise dos parâmetros de fotodegradação

Teste de irradiância				
		Δt	Potência	Solvente/Concentração
1.	10mWcm^{-2}	300s	10mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
2.	10mWcm^{-2}	300s	10mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
3.	20mWcm^{-2}	150s	20mW	AM água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
4.	20mWcm^{-2}	150s	20mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
5.	30mWcm^{-2}	100s	30mW	AM água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
6.	30mWcm^{-2}	100s	30mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
7.	40mWcm^{-2}	75s	40mW	AM água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
8.	40mWcm^{-2}	75s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
Teste de exposição radiante				
		Δt	Potência	Solvente/Concentração
1.	$2,4\text{Jcm}^{-2}$	60s	40mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
2.	$2,4\text{Jcm}^{-2}$	60s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
3.	$4,8\text{Jcm}^{-2}$	120s	40 mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
4.	$4,8\text{Jcm}^{-2}$	120s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
5.	$7,2\text{Jcm}^{-2}$	180s	40mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
6.	$7,2\text{Jcm}^{-2}$	180s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
7.	$9,6\text{Jcm}^{-2}$	240s	40mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
8.	$9,6\text{Jcm}^{-2}$	240s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$
9.	12Jcm^{-2}	300s	40mW	AM água deionizada -10 $\mu\text{g/mL}$
10.	12Jcm^{-2}	300s	40mW	AT água deionizada - 10 $\mu\text{g/mL}$

Com o corante AM foi realizado um segundo teste para se verificar o efeito da irradiação com banda larga $\pm 10\text{nm}$ (LED) ou banda estreita $\pm 2\text{nm}$ (laser) na dinâmica de fotodegradação.

Para a realização dos testes com banda larga, uma nova variável foi analisada a fim de se obterem informações sobre o uso de banda larga: irradiação das duas principais bandas de absorção na região do vermelho visível, ou de somente a banda de monômeros, que é a usualmente utilizada.

Para esta finalidade, confeccionou-se um filtro com transmissão de 96,34% no comprimento de onda de $\lambda=660\text{nm}$, e de 9,02% no comprimento de onda de $\lambda=610\text{nm}$. A FIG. 5 representa o espectro de transmissão do filtro. A TAB. 2 descreve a sequência de testes realizados.

Figura 5- Espectro de transmissão do filtro utilizado nos testes de banda larga.

Tabela 2 – Sequência de testes realizados para análise das bandas de irradiação.

Teste de Bandas de Irradiação				
	Δt	Potência	Concentração	Tipo de irradiação
1.	180s	40mW	AM água 10 μ g/mL	Banda Larga (BL)
2.	180s	60mW	AM água 10 μ g/mL	Banda Larga Filtro (BLF)
3.	180s	40mW	AM água 10 μ g/mL	Laser

Os resultados obtidos foram analisados em *software* apropriado.

4.5 – EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA.

Para as medidas de eficiência fotodinâmica foram empregados dois métodos. O primeiro método consistiu na análise da variável solvente em relação à medida da formação de oxigênio singleto. Esta medida foi realizada através da análise da emissão fosforescente no infravermelho próximo ($\lambda=1268\text{nm}$). Para todas as variáveis analisadas, testes microbiológicas foram executados verificando-se *in vitro* cada um dos parâmetros analisados.

4.5.1 - Produção de Oxigênio Singleto

A análise da produção de oxigênio singleto foi realizada em solução de AM 30 μ M (10 μ g/mL) preparada em D₂O, que permite um maior tempo de vida do ¹O₂

por apresentar menor ressonância com sua energia de desativação, e em solução salina 0,9% prepara em D₂O na mesma concentração.

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 do AM 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 temporal de 10 μs e 10Hz, excitando. O comprimento de onda de emissão foi selecionado utilizando-se filtro de sílica e monocromador com banda de interferência, o sinal passava então a um detector de germânio (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido) conectado a osciloscópio (R5509 from Hamamatsu Co., Bridgewater, EUA), interfaceado com microcomputador. 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 software apropriado.

4.5.2 - Testes Microbiológicos

As análises microbiológicas foram realizadas em culturas de *E. coli* HB101, em fase estacionária de crescimento, obtidas após cultivo por 48h em caldo BHI

(*brain and heart infusion*). Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata.

Cinco séries de testes foram realizadas para a verificação das seguintes variáveis: solvente, concentração, exposição radiante, irradiância e fonte de excitação.

Para a análise da influência do solvente, amostras contendo aproximadamente 10^8 células/mL foram empregadas. Um-mL da solução bacteriana em BHI foi coletado e acondicionado em recipiente apropriado e fechado, sendo então centrifugado a 3000rpm durante 10 min. As células foram suspensas em 1mL de água deionizada ou 1 mL de solução salina 0,9% de acordo com os grupos estudados.

Em placa de 96 poços, foram colocadas alíquotas de 100µL de AM a 60µM e 100µL de AT a 60µM dissolvidos em salina 0,9% ou água deionizada, de acordo com o grupo estudado, e foram acrescidos 100µL de suspensão bacteriana nos respectivos solventes para obtenção da concentração final de corante de 30µM.

As amostras foram divididas nos seguintes grupos - Grupo Controle Ambiental Água (GCAA) e Grupo Controle Ambiental Solução Salina 0,9% (GCSS): 100µL de suspensão bacteriana e 100µL de solvente foram colocados em um dos poços e permaneceram em repouso durante todo o experimento para obtenção da redução microbiana promovida pelo procedimento experimental.

Grupos Tempo de Pré-Irradiação Água (GTPIA) e Solução salina 0,9% (GTPIS): nestes grupos 100µL de suspensão bacteriana e 100µL de solução contendo fotossensibilizador, em cada solvente testado, foram mantidos por 3 min no escuro para obtenção da toxicidade intrínseca do AM e do AT.

Grupo Tratamento Solução Salina (GTSS): 100 μ L de suspensão bacteriana e 100 μ L de corante dissolvidos em solução salina foram irradiados diretamente nos poços com laser de diodo $\lambda=660\text{nm}$ (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil) com potência fixada em 40mW com tempo de exposição de 2min para o AM e com LED $\lambda=645\text{nm}$ (Protótipo LED 630, MMOptics, São Carlos, Brasil) mantendo-se a mesma potência e tempo de exposição (40mW - 2min). Grupo Tratamento Água (GTA): este grupo recebeu o mesmo tratamento do GTSS com a variação apenas do solvente (água deionizada).

A ponteira do laser ou do LED foi colocada perpendicularmente a abertura dos poços e a irradiação era efetuada com ângulo de incidência de 90°. A FIG. 6 demonstra o método de irradiação. Para evitar um possível efeito cumulativo devido ao espalhamento da radiação, cada amostra era irradiada e coletada individualmente.

Figura 6 – Modo de Irradiação das amostras microbiológicas.

Após cada tratamento proposto, dez- μ L de solução contendo microorganismos foram removidos e passaram por diluição seriada em 90 μ L de solução salina tamponada com fosfato até a diluição de 10^{-6} . Dez- μ L de cada diluição foram retirados e colocados em placas contendo agar BHI e incubadas

em estufa de crescimento a 37°C por 12 h, quando foi realizada a contagem de ufc (unidades formadoras de colônias)/mL.

Para a análise da influência da concentração na fotossensibilização letal, amostras contendo aproximadamente 10^8 células/mL foram empregadas. Um mL da solução bacteriana foi centrifugado a 3000rpm durante 10 min. As células foram suspensas em 1mL de água deionizada.

Em placa de 96 poços, foram colocadas alíquotas de 100µL de AM a 600µM, 100µL de AM a 60µM, 100µL de AT a 600µM e 100µL de AT a 60µM, dissolvidos água deionizada. Foram acrescentados 100µL de suspensão bacteriana para obtenção da concentração final de corante de 300µM ou 30µM.

As amostras foram divididas nos grupos controle ambiental (GCA), preparado em água conforme a descrição supramencionada, e grupos tempo de pré-irradiação (GTPI), preparados com as duas concentrações, seguindo a metodologia proposta para a análise do solvente.

Grupo Tratamento 300µM (GT300) e 30µM (GT30) foram realizadas as irradiações nestes grupos seguindo-se a mesma metodologia com tempo de exposição de 2min e potência de 40mW.

Após cada tratamento proposto, dez-µL da solução contendo microorganismos foram removidos e passaram por diluição seriada em 90µL de solução salina tamponada com fosfato até a diluição de 10^{-6} . Dez-µL de cada diluição foram retirados e colocados em placas contendo agar BHI e incubadas em estufa de crescimento a 37°C por 12 h, quando foi realizada a contagem de ufc (unidades formadoras de colônias)/mL.

Para a análise da influência da exposição radiante e da irradiância as amostras foram preparadas com 30µM de AM ou AT. A TAB. 3 apresenta a seqüência de testes realizados para a análise da exposição radiante e irradiância.

Tabela 3 – Seqüência de testes microbiológicos realizados para análise da exposição radiante e irradiância.

Grupo	Condição avaliada	Nomenclatura
Controle Ambiental		G1
Tempo de pré-irradiação AM	5 min sem irradiação	G2 AM
Tempo de pré-irradiação AT	5 min sem irradiação	G2 AT
Exposição radiante 1 AM	1 min – 40mW	G3 AM
Exposição radiante 2 AM	2 min – 40mW	G4 AM
Exposição radiante 3 AM	4 min – 40mW	G5 AM
Exposição radiante 1 AT	1 min – 40mW	G3 AT
Exposição radiante 2 AT	2 min – 40mW	G4 AT
Exposição radiante 3 AT	4 min – 40mW	G5 AT
Irradiância 1 AM	10 mW – 5 min	G6 AM
Irradiância 2 AM	20 mW – 2min e 30s	G7 AM
Irradiância 3 AM	40mW – 75s	G8 AM
Irradiância 1 AT	10 mW – 5 min	G6 AT
Irradiância 2 AT	20 mW – 2min e 30s	G7 AT
Irradiância 3 AT	40mW – 75s	G8 AT

Para o teste da exposição radiante foram utilizados os tempos de irradiação de 1,2 e 4min mantendo-se a potência constante e seguindo-se a metodologia proposta anteriormente. Para os testes de irradiância as irradiações foram realizadas mantendo-se a exposição radiante constante com alteração da irradiância. Foram utilizadas as potências de 10mW por 5 min, 20mW por 2min e 30seg e 40mW por 75 seg. Foram realizadas após 12h as contagens de ufc/mL.

O teste de fonte de irradiação foi realizado com amostras de AM 30 μ M em solução aquosa. As amostras foram irradiadas utilizando laser de diodo $\lambda = 660\text{nm}$ (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil) mantendo-se a potência constante de 40mW com tempo de exposição de 2min, LED $\lambda = 630\text{nm}$ (Protótipo LED 630, MMOptics, São Carlos, Brasil) mantendo-se a mesma potência e tempo de exposição (40mW - 2min).

Foi realizado um teste adicional para observação da eficiência relativa do LED em relação às duas principais bandas de absorção. Para esta finalidade a mesma concentração de Fs foi irradiada com LED mais filtro para corte da banda de $\lambda = 610\text{nm}$ na potência de 60mW, portanto com uma potência 50% maior do que a utilizada sem o filtro (40mW) para compensar a perda de potência devido ao uso do filtro.

Os grupos foram divididos em GCA (Controle ambiental), GTPI (Tempo de pré-irradiação), GTLA (Tratamento laser) e GTLE (Tratamento LED) e GTF (Grupo tratamento filtro).

Todos os resultados microbiológicos foram analisados estatisticamente através do teste *t Student* sendo que, a contagem inicial de bactérias considerada, foi a quantidade sobrevivente obtida, após contagem do GCA. O nível de significância aceito foi de $p > 0,05$.

5 – RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 - Estudo dos solventes em relação à presença de oxigênio dissolvido e pH.

Todos os solventes utilizados apresentaram uma concentração média de oxigênio dissolvido semelhante. A análise estatística revelou uma diferença significativa entre a água deionizada e a solução salina 0,9% ($p = 0,0049$). As médias obtidas e seus respectivos desvios padrão calculados estão descritos na TAB. 4.

Tabela 4 – Média e desvios padrão da quantidade de O₂ dissolvido nos solventes analisados.

Solvente	Média e desvio padrão da quantidade de O ₂ dissolvido (ppm)	
Água deionizada	7,48 ±0,01	N=10
Água destilada	7,43 ±0,03	N=10
Água estéril	7,45 ±0,04	N=10
Solução salina 0,9%	7,37 ±0,04	N=10
Solução salina 0,45%	7,41 ±0,05	N=10

Na FIG. 7 está apresentado o Box plot dos dos valores obtidos.

Figura 7 – Box Plot dos valores de oxigênio dissolvido nos solventes testados.

O oxigênio dissolvido em uma solução pode variar com a altitude, pressão e salinidade conforme descrito anteriormente⁸⁵. A hipótese testada neste estudo era a de que 0,9% ou 0,45% de sal em uma solução não iria afetar o oxigênio dissolvido. De acordo com os resultados, dentro da precisão da medida, dada pela precisão do equipamento (0,01ppm), 0,9% de NaCl é suficiente para diminuir a quantidade de O₂ dissolvido no solvente. Como a saturação de O₂ é dependente da salinidade, mesmo havendo trocas com o meio ambiente, a saturação de O₂ em solução salina 0,9% é mais facilmente alcançada do que em água. Porém, para a área de interesse deste estudo à diferença na quantidade de oxigênio dissolvido obtido entre as amostras, pode não ser relevante para as observações em relação à eficiência fotodinâmica.

Em relação ao pH, os valores obtidos para os solventes puros e pós-dissolução estão apresentados na TAB. 5.

Tabela 5 – Valores de pH obtidos nos solventes puros e após dissolução dos corantes.

Solvente	pH inicial	pH pós dissolução do Fs
Água deionizada	6,3	5,8
Água destilada	6,1	5,7
Água estéril	6,0	5,3
Solução salina 0,9%	6,0	5,5
Solução salina 0,45%	6,1	5,4

Para alguns autores, a reação fotodinâmica refere-se apenas à reação do tipo II envolvendo oxigênio singleto, portanto, a disponibilidade de oxigênio molecular estaria diretamente relacionada ao efeito fotodinâmico em uma solução. A formação de oxigênio singleto dependeria da transferência de energia do estado tripleto excitado do fotossensibilizador ($^3\text{Fs}^*$) para o oxigênio molecular dissolvido ($^3\text{O}_2$) obedecendo a seguinte reação:

onde k é a constante de transferência de energia em um determinado meio ⁸⁶.

O resultado da análise estatística, dos valores de oxigênio dissolvido nos solventes estudados, indica a possibilidade de diferenças entre a solução salina 0,9% e a água deionizada, porém, como as médias são muito próximas (7.37 e 7.48, respectivamente), a quantidade de oxigênio dissolvido pode não ser decisiva para uma possível diferença no efeito fotodinâmico obtido na presença destes solventes *in vitro*. Assim, como os valores de $^3\text{O}_2$, os valores de pH das soluções estudadas também são muito próximos.

Em solução aquosa, o tempo de vida do estado tripleto é marcadamente dependente do pH. O aumento do tempo de vida do estado tripleto em pHs mais altos deve-se a alcalinidade dos estados excitados, quando comparado ao estado fundamental. Em pHs próximos de 3, há a possibilidade de formação de fotossensibilizadores reduzidos, como é o caso do AM, que seria representado em sua forma protonada por AMH^{2+} , sendo conhecido como leuco-azul de metileno. A velocidade de formação do oxigênio singleto com as duas formas de AM ocorreria na seguinte ordem: pH 3: $\text{AMH}^{2+} = 1,3 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que para o AM, a constante seria: pH 8.5: $26 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, com rendimento quântico para a formação de oxigênio singleto de 0,2 em pH 3 e 0.95 em pH 9.

Levando-se em consideração este fato, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o pH das soluções contendo o fotossensibilizador são abaixo de 6. Portanto, os estudos na literatura que utilizam solução salina tamponada com fosfato (PBS), como os recentemente publicados por Tegos *et al.* (2006)⁷ e Demidova e colab. (2005), podem ter seus resultados, em parte, alterados pelo ajuste de pH, uma vez que a solução salina tamponada com fosfato, funciona como balanceador de pH. De acordo com o dado acima apresentado, um aumento de 6 pontos no pH leva a um rendimento quântico para a produção de oxigênio singleto 4,5 vezes maior.

A solução salina tamponada não é de uso corrente na prática clínica, seu uso está relacionado a estudos microbiológicos com a finalidade de manutenção da viabilidade de microorganismos.

5.2 - Efeito da concentração e solvente na agregação do corante.

5.2.1 – Concentração

A FIG. 8 representa a variação do espectro de absorção do AM em água deionizada em três concentrações decrescentes 250 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL.

Pode ser observado o efeito de metacromasia, representado pela mudança da absorção máxima do corante para menores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico), acompanhado pelo declínio da absorção máxima nos maiores comprimentos de onda (efeito hipocrômico), devido ao aumento da concentração. Esse efeito é observado devido ao processo de agregação.

A substituição dos picos de absorção máxima entre a banda de dímeros localizada próxima a $\lambda=610\text{nm}$ e a de monômeros localizada em torno de $\lambda=660\text{nm}$ para o AM pode ser prontamente observada.

Figura 8 – Espectros de absorção de solução de AM em água deionizada nas concentrações de 250µg/mL (eixo da esquerda), 20 e 10 µg/mL (eixo direito)

A FIG. 9 representa a relação AD/AM (Absorção do Dímero/Absorção do Monômero). Pode ser observado que, em altas concentrações ocorre uma predominância de dímeros, enquanto que nas soluções menos concentradas, a relação é alterada, demonstrando a prevalência do pico de monômeros em relação aos dímeros.

Figura 9 - Relação dos picos de absorção máxima de dímeros e monômeros para AM em água deionizada nas concentrações de 3 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M e 480 μ M.

Relação semelhante foi obtida com o AT, como pode ser observado nas FIG. 10 e 11. A FIG. 10 representa os espectros de absorção obtidos da dissolução de AT em água deionizada nas concentrações de 1mg/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL e 100 μ g/mL. As soluções mais concentradas (1mg/mL e 500 μ g/mL), mesmo com caminho óptico de 0,1cm, não permitem a passagem da radiação incidente nos comprimentos de onda de absorção máxima, não possibilitando a análise de seus respectivos picos de absorção. Na concentração de 100 μ g/mL ainda pode ser observada a prevalência do pico de absorção máxima localizada na região correspondente a dímeros, que para o AT fica próxima a λ =590nm, enquanto que a de monômeros se encontra em λ =630nm. A FIG. 11 representa a relação AD/AM para o AT nas concentrações de 1mg/mL até 5 μ g/mL. A mesma dinâmica observada com o AM repete-se na avaliação do efeito da concentração sobre os picos máximos de absorção do AT.

Figura 10 – Espectro de absorção do AT em água deionizada nas concentrações de 1000µg/mL a 100µg/mL.

Figura 11 – Relação AD/AM para AT nas concentrações de 3,2mM a 16µM. Para as concentrações mais altas, devido à saturação o cálculo foi feito através da suavização das curvas pelo programa Microcal Origin 6.0.

A FIG. 12 apresenta os efeitos da agregação de AT nas concentrações de 50µg/mL a 10µg/mL. A banda de absorção máxima localiza-se sobre a região correspondente a monômeros apenas nas menores concentrações.

Figura 12 – Espectros de absorção da dinâmica de agregação de AT nas concentrações de 10µg/mL a 50µg/mL

Como vários fatores interferem na eficiência da terapia fotodinâmica, os resultados obtidos em relação à morte de microorganismos não são completamente homogêneos. Usualmente, a eficiência dos Fs (rendimento quântico para estado tripleto, tempo de vida dos estados excitados, potencial redox)^{2,11,22} é avaliada com base nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas de suas espécies monoméricas.

A participação de dímeros de AM e AT em processo fotodinâmico foi recentemente demonstrada contra várias espécies microbianas. Os corantes AM e AT são metacromáticos; em situações como o aumento da concentração, presença de polímeros aniônicos ou sais inorgânicos, ocorre uma mudança em

seu espectro de absorção devido à agregação das moléculas. Este efeito, conhecido como metacromasia, é a mudança da absorção máxima do corante para menores comprimentos de onda ("*blue shift*").

Apesar do papel de dímeros poder ser importante para a resposta fotodinâmica, as fontes de excitação deveriam ativar esta banda de forma apropriada. Nos casos em que lasers são empregados para a ativação do corante, o comprimento de onda de seleção para ativação do corante é sempre o da banda correspondente a espécies monoméricas, independente da concentração empregada, do tipo de solvente e do substrato utilizado. Este fato impediria a participação direta das espécies agregadas no processo fotodinâmico.

Para a avaliação do efeito antimicrobiano dos corantes, normalmente as concentrações são aumentadas de forma gradual até obter-se o efeito antimicrobiano desejado^{11,6,70,83}. As concentrações utilizadas em diferentes estudos variam de forma bastante intensa, indo desde 5µM (1,52µg/mL para o AT e 1,87µg/mL para o AM)^{11,87} até 3mM (aproximadamente 1mg/mL para o AT e AM)⁸⁸. De acordo com os resultados observados na FIG. 11, nas concentrações acima de 30µM (≈ 10µg/mL ou 0,01%), para o AT a contribuição da banda de dímeros na absorção do corante se torna cada vez mais expressiva.

Os dados reportados por Usacheva e colab.¹¹ fornecem indícios de que o aumento da concentração de corante pode não resultar em um aumento real da eficiência terapêutica. Em seu estudo, os autores observaram que, aumentando a concentração do corante, sob a mesma exposição radiante, aplicada com um laser centrado nas bandas de absorção de monômeros, obteve-se um maior grau de fotoinativação, porém, após sucessivos aumentos de concentração, um platô foi alcançado, onde mesmo aumentando-se a concentração, não se observava melhor efeito fotodinâmico. Interessantemente, o platô foi representado por valores distintos dependendo do tipo e gênero da bactéria estudada, o que representaria uma dependência em relação ao meio ambiente em que o

fotossensibilizador agiria. Para o AT, as concentrações que atingiram o platô foram a partir de: 5 μ M-1,5 μ g/mL (*Streptococcus pneumoniae*), 10 μ M-3 μ g/mL (*Enterococcus faecalis*), 30 μ M-9 μ g/mL (*Staphylococcus aureus*) e 150 μ M-45 μ g/mL (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Para o AM, os valores de platô foram: 15 μ M-5,6 μ g/mL (*Streptococcus pneumoniae*), 30 μ M-11 μ g/mL (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e 150 μ M- 56 μ g/mL (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Observando-se as FIG. 9 e 11, podemos notar que nas concentrações relatadas ocorre, na maioria das condições, a prevalência da banda de monômeros. Recentemente, em um estudo realizado *in vitro*, Williams e colab⁸⁹ concluíram que bactérias poderiam ser mais sensíveis aos aumentos na exposição radiante aplicada do que aos aumentos na concentração de fotossensibilizador.

Observando-se os espectros de absorção obtidos neste estudo, além do claro efeito de metacromasia devido à agregação, uma alteração mais discreta pode ser observada nos comprimentos de onda próximos a $\lambda=250$ nm. Com o aumento da concentração no AM ocorre a formação de uma banda de absorção com centro próximo a $\lambda=240$ nm (Fig 8). Para o AM, a banda em 256nm corresponderia à formação de leuco-azul de metileno (LAM)⁹⁰. Esta forma reduzida de AM, como descrito anteriormente, tem forte tendência de aparecimento em baixos pHs , e como de acordo com os resultados apresentados neste estudo, a adição de corante ao solvente promove a diminuição do pH; altas concentrações de corante podem promover além do efeito metacromático nas bandas da região do visível, o aparecimento da forma reduzida do corante. Como a forma reduzida do corante não possui efeito fotodinâmico, o resultado obtido neste estudo forneceria mais um indício para explicar o motivo de em estudos anteriores realizados *in vitro* e *in vivo*^{11,88} altas concentrações de corante não promoverem melhores efeitos fotodinâmicos. A forma reduzida do AM, na presença de oxigênio, retorna à forma não protonada inicial, logo, seu

aparecimento pode estar relacionado não somente com a queda do pH como também com a diminuição da concentração de oxigênio na solução .

Quanto à toxicidade intrínseca destes corantes, em diferentes concentrações, na ausência de luz, a chamada toxicidade no escuro, os valores reportados também variam intensamente entre os estudos. Phoenix e colaboradores reportaram que a concentração de 50µM seria a mínima concentração letal (MCL) para *Staphylococcus aureus* no escuro, incubado com AT, sendo que, na presença de luz esta concentração cairia para 12,5µM com uma razão de escuro/luz de 4. Já no estudo de Usacheva *et al.*, a mínima concentração letal, contra a mesma bactéria (*S. aureus*) de três diferentes linhagens, foi de 26µM. Apesar de não haver um consenso a respeito da MCL, é bem estabelecido que a MCL para bactérias Gram-negativas é maior que para as Gram-positivas e que a concentração necessária para reduzir-se microorganismos Gram-negativos mesmo sob iluminação é maior.

Uma vez que, em estudos *in vivo*, a presença de biofilmes múltiplos compostos por variadas espécies bacterianas, é a condição mais provável em qualquer tecido alvo ⁹¹, a toxicidade intrínseca das diversas concentrações se torna mais importante em relação às células normais do hospedeiro do que em relação aos microorganismos. Neste contexto, o trabalho de Zeina *et al.*⁹² mostra que a taxa de morte celular provocada em células de queratinócitos humanos é de 18 a 200 vezes menor do que a taxa de morte promovida em bactérias e fungos, sendo que ciclos de PDT suficientes para reduzir até 7 logs (ANEXO A) de microorganismos teriam pouco efeito citotóxico utilizando-se AM.

Em relação ao AT, sua toxicidade no escuro, contra fibroblastos e queratinócitos orais humanos, foi considerada baixa, quando comparada à toxicidade alcançada contra *Streptococcus sanguis* ⁹³.

5.2.2 – Solvente

As FIG. 13 e 14 representam os espectros de absorção do AT em água destilada e solução salina 0,45% nas concentrações de 10µg/mL e 15 µg/mL. Observa-se que em solução salina, mesmo na menor concentração (10µg/mL), o AT apresenta uma relação AD/AM maior que a da concentração de 15 µg/mL em água destilada, o que denota o favorecimento à agregação nestas condições.

Os mesmos efeitos, porém mais pronunciados, foram observados com o uso da solução salina 0,9% como solvente, conforme pode ser observado nas FIG. 15 e 16 e a tendência de dimerização foi comprovada através da espectroscopia de fluorescência (Fig 15a).

Figura 13. Espectros de absorção de AT em solução salina 0,45% e água destilada, nas concentrações de 10µg/mL e 15 µg/mL.

Figura 14. Relação AD/AM de AT em solução salina 0,45% e água destilada nas concentrações e 10µg/mL e 15 µg/mL.

De todos os solventes testados, somente a solução salina apresentou diferença na agregação do corante em relação aos demais. Os dois corantes testados apresentaram pior diluição em solução salina, mesmo em baixas concentrações. Como pode ser observado nas FIG. 15 e 16, o uso de solução salina 0,9% piora a diluição do corante de forma mais acentuada que a solução salina 0,45% (Fig 13), porém, somente o AT apresenta um deslocamento do pico de absorção máxima (*“blue shift”*) em salina (Fig. 16), sendo que este efeito pode ser observado em ambas as concentrações (0.9 e 0,45%).

A tendência de dimerização em solução salina pode ser prontamente detectada tanto pelos espectros de absorção como pelo espectro de fluorescência (FIG. 15a). Como o dímero de AM não apresenta fluorescência, a mesma concentração de corante em diferentes solventes apresenta variação no espectro de fluorescência.

Figura 15. Espectro de absorção do AM 10 µg/mL em solução salina 0,9% e água deionizada e relação AD/AM (insert).

Figura 15a. Espectro de fluorescência do AM 30 µM (10 µg/mL) em solução salina 0,9% e água deionizada com excitação em $\lambda=532\text{nm}$

Figura 16. Espectro de absorção do AT 10 µg/mL em solução salina 0,9% e água deionizada e relação AD/AM (*insert*).

Uma vez que todos os solventes testados possuem a mesma polaridade, um efeito solvatocrômico, que é a mudança do espectro de absorção devido à dissolução do soluto em solventes com diferente polaridade⁹⁴, não é esperado.

Os dois corantes apresentam coeficiente de partição $P < 0$ sendo considerados hidrofílicos, porém, o AT apresenta um $\log P$ de 0,33 e o AM de 0,11. O uso da solução salina, seja em sua forma pura, seja na forma de solução tamponada com fosfato, é uma constante em estudos de PDT antimicrobiana^{7,11,12,14,20,70,84,87,92}. Além da pior solubilidade aqui demonstrada, pode ser observado, na presença de solução salina, o efeito agregacional. Este efeito é gerado pela presença do sal que favorece a formação de dímeros, por diminuir a repulsão eletrostática entre monômeros.

A constante de dimerização medida para o AM em água destilada é de $4,7 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ e em solução salina 0,45% é de $7,5 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ ¹⁴. Para o AT, as constantes de dimerização em salina 0,45% e água destilada são de $24 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ e

$10,3 \times 10^3 \text{M}^{-1}$, respectivamente . Portanto, os resultados obtidos refletem os valores apresentados na literatura, com o AT sendo mais propenso à dimerização tanto em água como em solução salina.

Durante a aplicação clínica da PDT antimicrobiana, bem como em estudos *in vitro* realizados na presença de microorganismos, um somatório de eventos deve levar à prevalência de dímeros em relação a monômeros. Além do solvente poder iniciar o processo de agregação, a presença de bactérias dará continuidade a este processo . Indícios da possível importância deste processo podem ser obtidos através da análise dos resultados do trabalho de Usacheva e colab , que demonstra a dinâmica de agregação na presença de lipopolissacarídeos provenientes da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Além dos LPs causarem agregação, o grau de agregação depende da natureza do composto, uma vez que a agregação foi maior na presença de lipopolissacarídeos provenientes de *Escherichia coli* e de *Pseudomonas aeruginosa*. Conforme descrito anteriormente, estas duas espécies demandaram maior concentração de corante para a redução microbiana, além do fato de apresentarem as maiores concentrações para observação do platô em relação ao aumento de concentração versus aumento da redução bacteriana .

Uma vez que o meio promove alterações na dinâmica de dissolução do corante, a presença de fluidos orgânicos foi investigada neste estudo. O efeito da presença de fluidos orgânicos sobre a absorção do corante pode ser observado na FIG. 17. A presença de soro de sangue altera o formato da banda de absorção de forma mais expressiva que a saliva, promovendo um deslocamento da absorção máxima (“*red shift*”) de 12nm, enquanto que a presença de saliva promoveu um deslocamento de 3nm. Além do deslocamento foi observada uma banda de absorção nova em aproximadamente $\lambda=400\text{nm}$. Esta banda deve corresponder à banda de Soret característica de porfirinas que devem estar presentes no soro de sangue.

Figura 17 – Espectro de absorção da solução de AT 100 µg/mL em solução salina 0,9%, e em solução contendo saliva e soro de sangue.

O resultado obtido através da análise do espectro de absorção, obtido neste estudo com a adição de saliva ao corante, assemelha-se ao resultado obtido por Zhang e Tang ⁹⁵ após a adição de DNA à solução de AM. O efeito hipocrômico observado com a adição de saliva obtido neste estudo foi observado no estudo desses autores com a adição de DNA. Não foram detectadas alterações nos picos de absorção.

O efeito hipocrômico deve estar relacionado com a intercalação do corante com o DNA presente na saliva. Os corantes fenotiazínicos apresentam alta afinidade por reações de intercalação com o DNA. A reação das fenotiazinas com o DNA leva ao aparecimento da forma reduzida do corante.

Apesar das alterações iniciais, promovidas pela adição de saliva ao corante, se restringiram ao efeito hipocrômico; a tendência de dimerização ocorre

com o tempo conforme pode ser observado na FIG. 18. Passado 1 min da mistura, uma alteração na relação AD/AM pode ser notada, sendo que, esta alteração continua até o tempo de 5 minutos. Este fato pode ter importância para a escolha de tempos de pré-irradiação na cavidade oral, aonde a mistura entre o Fs e a saliva é provável.

Figura 18 – Razão AD/AM para AM após mistura com saliva nos tempos imediato, 1min e 5min.

A adição de LPs à solução de AT em salina 0,45% também promove efeito hipocrômico, semelhante ao observado neste estudo.

A maior alteração na absorção, observada neste estudo, após a adição de soro de sangue, pode explicar em parte, os resultados descritos por Batthi e colab⁹⁶. Em seu trabalho, os autores descreveram um efeito menos pronunciado da fotossensibilização letal de *Porphyromonas gingivalis* na presença de soro de sangue e saliva, sendo que, a presença de soro de sangue causou alterações mais evidentes, denunciadas pela menor taxa de morte obtida quando este fluido

era adicionado à solução. Os autores neste trabalho, também observaram que em baixos pHs a taxa de redução obtida era diminuída quando comparada ao pH neutro.

A presença de uma nova banda de absorção em $\lambda=406\text{nm}$ denota a presença de porfirina do plasma sanguíneo no sistema. As porfirinas apresentam banda de absorção característica em $\lambda= 400\text{nm}$ (Banda de Soret).

A irradiação de AM na presença de citocromo *c*, que apresenta o grupo heme característico das porfirinas, leva a fotodegradação da banda de Soret, principalmente quando ERO outras que não o oxigênio singlete, são formadas⁹⁷. Portanto, na presença de soro de sangue as ERO podem apresentar uma menor eficiência antimicrobiana, uma vez que, ao invés de atacarem sítios que levariam a destruição de microorganismos, essas espécies promoveriam a degradação da porfirina não aumentando assim a eficiência na redução microbiana.

Estas evidências corroboram os resultados deste estudo, mostrando que as alterações espectroscópicas aqui observadas podem ter relação direta com a eficiência na redução de microorganismos observada *in vitro*.

5.3 Efeito da temperatura na agregação do corante

As FIG. 19 e 20 representam o efeito do aumento de temperatura no espectro de absorção dos corantes. Pode-se observar que em água deionizada (Fig 18), a temperatura não promove alterações significantes na absorção do corante. Já em solução salina 0,9%, (Fig 20) há um aumento da absorção após o aquecimento da solução tanto na concentração de $250\mu\text{g/mL}$ como na de $100\mu\text{g/mL}$.

Figura 19 - Espectros de absorção de AT em água deionizada a 100µg/mL e 250µg/mL nas temperaturas de 22°C e 37°C.

Figura 20 – Espectros de absorção de AT em solução salina 0,9% a 100µg/mL e 250µg/mL nas temperaturas de 22°C e 37°C.

Este resultado se deve ao fato da dissolução do corante ser um processo endotérmico. Logo, o aquecimento da solução desloca o equilíbrio no sentido endotérmico, facilitando a solubilização do corante, pois a temperatura aumenta a velocidade da reação ⁹⁸.

Não foi objetivo deste estudo calcular o coeficiente de solubilidade dos corantes, uma vez que a variação de temperatura a qual o corante será exposto está entre a temperatura ambiente e a temperatura do corpo humano (aproximadamente 36,5°C), visto que, as condições de irradiação não gerariam aumentos significantes de temperatura.

O efeito da temperatura foi analisado, pois todas as condições estudadas encontravam-se em temperatura ambiente e na aplicação *in vivo*, um aumento de temperatura poderá ocorrer, uma vez que o tempo de pré-irradiação pode promover um aumento de temperatura da solução devido ao equilíbrio térmico entre a solução aplicada e o meio biológico.

O tempo de incubação é considerado um importante fator na dosimetria da PDT por permitir maior interação entre o fotossensibilizador e a célula, permitindo, inclusive, a entrada do mesmo no interior do citoplasma, o que aumentaria os possíveis alvos de ataque das ERO.

Nas aplicações *in vitro*, o tempo de pré-irradiação apresenta resultados bastante significantes, como na utilização de AM para inativação de *E. coli*, onde foi reportado que a incubação de *E. coli* por 15 minutos com o corante resultou em uma redução de aproximadamente 2 logs (ANEXO A) maior do que no tratamento com AM sem incubação. Mais marcante ainda foi o resultado com AT na mesma bactéria, que após um período de incubação de 30 minutos promoveu uma redução de 4 logs, enquanto as mesmas condições sem incubação resultaram em uma redução de 1 log.

Apesar do aumento da absorção, a razão AD/AM permaneceu constante com os valores de 2,3 para a solução de 250µg/mL em salina 0,9% a 22° e 37°C, 1,69 para a solução de 100 µg/mL e de 1,1 para a solução de 10µg/mL em salina 0,9% a 22° e 37°C. Portanto os resultados deste estudo indicam que a temperatura somente altera a solubilidade do corante não alterando, porém, seu estado de agregação.

5.4 – Efeito de parâmetros físicos da radiação sobre a fotodegradação.

5.4.1 – Caracterização do LED

A FIG. 21 apresenta o resultado da caracterização do LED utilizado neste estudo. A medição de potência do LED indicou uma potência total de saída de 250mW. O pico da emissão foi em $\lambda=645\text{nm}$, com uma banda de $\pm 10\text{nm}$. A potência calculada para cada faixa espectral foi de aproximadamente 37,7mW entre $\lambda=610\text{nm}$ e $\lambda=629\text{nm}$, 164,5mW entre $\lambda=630\text{nm}$ e $\lambda=649\text{nm}$ e 36,2mW entre $\lambda=650\text{nm}$ e $\lambda=670\text{nm}$. Ainda nessa FIG., pode-se observar a sobreposição dos espectros de absorção dos corantes utilizados, com a emissão do LED. Para o AM, a emissão do LED permite a cobertura das duas principais bandas de absorção no visível, já para o AT, somente a banda monomérica pôde ser eficientemente excitada com esta emissão.

Figura 21 – Espectro de emissão do LED (eixo esquerdo) com as respectivas faixas de potência e espectros de absorção do AM e AT (eixo direito).

5.4.2 – Fotodegradação de AT - Irradiações realizadas com LED

5.4.2.1 – Irradiância $\left(\frac{W}{cm^2} \right)$

A FIG. 22 representa a sequência das irradiações realizadas sobre solução aquosa de AT 30 μ M para o teste de irradiância.

Figura 22 - Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução aquosa de AT 30 μ M com os parâmetros de 10mW – 300s (200mW/cm²), 20mW-150s (400mW/cm²), 30mW-100s (600mW/cm²) e 40mW-75s (800mW/cm²)

A FIG. 23 representa a relação AD/AM para cada uma das condições analisadas, mantida a exposição radiante constante de 60J/cm² (área de 0,05cm² correspondente ao diâmetro do feixe na saída).

Figura 23 – Valores da razão AD/AM para AT após irradiações 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s

A FIG. 24 representa os valores da absorção de monômeros e dímeros normalizados em relação à absorção inicial.

Figura 24 – Absorção de monômeros e dímeros de AT 30μM em solução aquosa normalizada.

Pela análise das FIG. 23 e 24, pode-se notar que apesar da relação AD/AM permanecer quase constante em todas as condições analisadas ocorre uma diminuição da absorção de monômeros e dímeros nas menores potências,

enquanto que as potências maiores de 30mW e 40mW apresentam aumento da tendência de dimerização.

A FIG. 25 apresenta a relação entre os picos de absorção do visível e do ultravioleta para o AT nas condições analisadas.

Figura 25 – Razão entre os picos de absorção máxima do AT no ultravioleta e no visível.

O resultado da análise de diferenças observadas nos espectros demonstra que as alterações promovidas na solução de AT após irradiação são dependentes da irradiância, sendo que as potências de 10 e 20mW apresentaram resultado similar, porém, diferente do obtido para as potências de 30 e 40mW. A FIG. 24 demonstra que com as potências de 10mW e 20mW ocorre queda da absorção de dímeros e monômeros, porém, com as potências de 30mW e 40mW, ocorre diminuição de monômeros e aumento de dímeros.

Na FIG. 25 pode ser observado que a queda da razão AD/AM é acompanhada pelo aumento da razão de absorção dos picos no UV, o que indica formação de espécies reduzidas do corante.

A reação de compostos fenotiazínicos, como o AT, com diferentes agentes redutores, apresenta uma dinâmica complexa ⁹⁹. O AT pode ser reduzido à forma conhecida como branco de toluidina (ATB). Esta transformação pode ocorrer pela redução por um ou dois elétrons e poderia ser acompanhada, espectroscopicamente, pelo aumento na absorção do composto na região do ultravioleta.

Sob irradiação, a maior parte dos Fs usados em estudos biomédicos são degradados. A resistência de um Fs à degradação pela radiação tem sido investigada, contudo os mecanismos de fotodegradação, e a natureza dos fotoprodutos, não têm sido determinados com frequência. Há evidências de que a fotodegradação de um Fs é causada pela reação do mesmo com as espécies reativas de oxigênio formadas durante a reação.

Reis descreve em seu trabalho, a fotodegradação da protoporfirina IX (PpIX) sob irradiação. Espectros de fluorescência foram obtidos em diferentes tempos para acompanhar a formação de fotoprodutos durante a irradiação. De acordo com o autor, quando a reação do fotossensibilizador for do tipo II envolvendo a transferência de energia do Fs para o oxigênio molecular, a fotodegradação do corante não ocorre, pois, o mesmo serviria apenas para transferir a energia ao oxigênio molecular, não sofrendo desta forma, qualquer alteração. Em seu trabalho foram obtidos espectros de fluorescência da PpIX, usando excitação com lâmpada de Hg emitindo em $\lambda=365\text{nm}$, após 15, 30 e 45 minutos de irradiação com laser de HeNe ($\lambda=632,8\text{nm}$), 8mW, intensidade de 10mW/cm^2 . O autor observou a formação de uma banda de fluorescência com pico em $\lambda=680\text{nm}$ nas amostras irradiadas, enquanto que nas amostras não irradiadas os picos característicos da PpIX em $\lambda=636.2\text{nm}$ e $\lambda=705.8\text{nm}$ foram preservados.

A não degradação da molécula do Fs pela radiação seria altamente desejável, uma vez que, o processo poderia ocorrer infinitas vezes. Porém, no

estudo de Ericson e colab, a fotodegradação da PpIX foi associada à produção de oxigênio singleto (reação do tipo II), sendo que, a formação de fotoprodutos durante a irradiação da PpIX foi diminuída com a adição de NaN_3 que atua como inibidor de oxigênio singleto, e aumentada com a adição de D_2O como solvente, no lugar de H_2O , sendo conhecido que, o tempo de vida do oxigênio singleto é maior em D_2O . Os autores observaram que a remoção do oxigênio do meio através do método de *Freeze-pump-thaw* (FPT) assegurava a estabilidade da molécula, associando desta forma a fotodegradação ao oxigênio. O estudo foi realizado através de espectroscopia de absorção e fluorescência. Os autores observaram uma pequena diminuição no sinal de fluorescência das amostras livres de oxigênio, porém, como não foram detectadas alterações na espectroscopia de absorção, a concentração inicial de PpIX foi mantida. A diminuição no sinal de fluorescência foi atribuída à formação de complexos fotoestáveis, que promoveram uma diminuição no rendimento quântico de fluorescência.

Em meios biológicos é esperado que a reação das ERO ocorra primariamente com biomoléculas alvo, e em menor escala, com a molécula sensibilizadora, portanto, a análise da fotodegradação em função da variação de parâmetros de irradiação pode ser útil para o estabelecimento de conceitos relacionados à dosimetria, porém, a mesma cinética de degradação pode não ocorrer em meios biológicos.

5.4.2.2 – Exposição radiante $\left(\frac{J}{\text{cm}^2}\right)$

Na FIG. 26 estão representados os espectros de absorção da solução aquosa de AT a $30\mu\text{M}$. Neste ensaio a potência do equipamento (LED) foi mantida constante em 40mW e variou-se o tempo de exposição de 1min a 5 min.

Diferente das alterações observadas com a irradiância, as alterações de exposição radiante resultam em um padrão de alteração uniforme, sendo que este padrão é modificado de forma discreta e direta pelo aumento do tempo de exposição.

O AT é um eficiente produtor de oxigênio singleto, com rendimento quântico relativo da ordem de 0.86 em relação ao AM, que teria rendimento quântico relativo de 1. Portanto, era esperado que sua dinâmica de fotodegradação fosse lenta nestas condições experimentais. No melhor de nosso conhecimento, a degradação do AT nunca foi reportada, sendo assim, a comparação dos resultados obtidos se torna inviabilizada.

Os tempos de irradiação escolhidos entre 1min e 5 min representam tempos clinicamente viáveis para a aplicação da terapia *in vivo*. Longos tempos de exposição inviabilizariam a aplicação desta técnica em infecções presentes na cavidade oral.

Figura 26 – Espectros de absorção das irradiações em AT com potência de 40mW e nos tempos de 1min (48J/cm²), 2min(96J/cm²), 3min (144J/cm²), 4min (192J/cm²) e 5min (240J/cm²), considerando-se a área do feixe na saída de 0,05cm².

A FIG. 27 representa a relação AD/AM para os diferentes tempos de irradiação e a FIG. 28 apresenta a análise da absorção normalizada.

Figura 27 – Valores da razão AD/AM para AT após irradiações com 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.

Figura 28 – Absorção de monômeros e dímeros de AT 30 μ M em solução aquosa normalizada.

Pela análise dos resultados, as alterações observadas na solução de AT com relação à exposição radiante empregada resultaram em um padrão de alteração uniforme. A razão AD/AM segue um padrão constante, bem como a análise da absorção máxima normalizada. A magnitude das alterações parece ter relação com a exposição radiante, uma vez que, aumentando-se o tempo de exposição, os efeitos parecem mais evidentes. Passado o primeiro minuto de irradiação as alterações de 2min a 5 min apresentam decréscimo quase constante da absorção nos picos máximos.

A degradação lenta de dímeros é esperada, uma vez que espécies agregadas são mais resistentes à fotodegradação do que sua contrapartida. Este fato pode ser observado de forma evidente na FIG. 24. Uma vez que a degradação de monômeros e dímeros parece ocorrer de forma simultânea no ensaio de exposição radiante (FIG. 28) aonde a potência de 40mW foi empregada nos diferentes tempos de exposição, poder-se-ia inferir que a degradação estaria relacionada com a irradiância e o tempo de exposição tornaria seus efeitos mais evidentes.

5.4.3 – Fotodegradação de AM - Irradiações realizadas com Laser

5.4.3.1 – Irradiância

A FIG. 29 representa os espectros de absorção do AM em solução aquosa 30 μ M após irradiação programada para o teste de irradiância.

Figura 29 - Espectros de absorção da seqüência de irradiações realizadas em solução de AM com os parâmetros de 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s

A FIG. 30 representa a relação AD/AM para cada uma das condições analisadas.

Figura 30 – Valores da razão AD/AM para AM após irradiações 10mW – 300s, 20mW-150s, 30mW-100s e 40mW-75s

A FIG. 31 representa os valores da absorção de monômeros e dímeros normalizados em relação à absorção inicial.

Figura 31 – Absorção de monômeros e dímeros de AM 30μM em solução aquosa normalizada

A dinâmica do AM apresenta resultados distintos quando comparada a do AT. A diminuição na absorção pelos dímeros pode ser notada em todas as condições de irradiação, porém, a absorção pelos monômeros, só é modificada nas potências intermediárias. A manutenção da concentração de monômeros pode ocorrer pela quebra de dímeros que gera conseqüente aumento de monômeros.

A dinâmica diferenciada observada nos dois compostos, pode ser resultado de alterações fotoquímicas diferentes, porém, pode ser inferido que a forma de irradiação seja uma variável a ser considerada. O AM nestes ensaios foi irradiado com laser de $\lambda=660\text{nm}$, enquanto o AT foi irradiado com fonte LED de $\lambda=6450\text{nm} \pm 10\text{nm}$. Logo, a variável fonte de irradiação deve ser analisada a fim de se observar se os efeitos são resultado de alterações químicas sofridas por estas moléculas, ou de diferente fotoquímica induzida pela irradiação.

A FIG. 32 apresenta a relação entre os picos de absorção do visível e do ultravioleta para o AM nas condições analisadas. Seguindo o mesmo padrão do AT, a queda de absorção no visível é seguida de aumento da absorção no UV inferindo o aparecimento da leucoforma de AM.

Figura 32 – Razão calculada entre os picos de absorção máxima do AM no ultravioleta e no visível.

5.4.3.2 – Exposição radiante

Na FIG. 33 estão representados os espectros de absorção da solução aquosa de AM. Neste ensaio, a potência do equipamento foi mantida constante em 40mW e variou-se o tempo de exposição de 1min a 5 min.

Figura 33 - Espectros de absorção da sequência de irradiações realizadas com AM com os parâmetros de 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.

A FIG. 34 representa a relação AD/AM para os diferentes tempos de irradiação.

Figura 34 – Valores da razão AD/AM para AM após irradiações com 40mW por 1min, 2min, 3min, 4min e 5min.

Na FIG. 35 observamos os valores da absorção normalizada para ambas as espécies.

Figura 35 – Absorção de monômeros e dímeros de AM 30μM em solução aquosa normalizada.

Observando-se as FIG. 34 e 35 pode-se notar que as transformações observadas nos espectros, em função da exposição radiante, seguem um padrão semelhante entre si, sendo que a magnitude das alterações torna-se mais expressiva com a ampliação do tempo de exposição.

O mecanismo de ação primário do AM é tido como sendo a reação do Tipo II, devido principalmente ao seu alto rendimento quântico para formação de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta} \approx 0,5$), o que levaria a um efeito mínimo de fotodegradação devido à reação Tipo I. Porém, a fotodegradação do corante, em um sistema fechado, pode ocorrer devido ao ataque do oxigênio singleto sobre a molécula do fotossensibilizador, uma vez que outros reagentes não estão disponíveis no meio.

Em sistemas biológicos, conforme citado anteriormente o mesmo processo pode não ser observado. Moléculas carregadas positivamente como o AM ao se ligarem, por exemplo a uma proteína, podem ter a reação do tipo I favorecida em decorrência de diversos fatores como a facilidade de transferência de elétrons entre o Fs e moléculas de proteína e o favorecimento da formação de agregados induzido por sítios hidrofóbicos das proteínas¹⁰⁰.

A avaliação dos parâmetros de irradiação em sistemas fechados pode ser útil para definir a função da exposição radiante e irradiância em relação ao Fs. Nestas condições, podemos inferir que a irradiância pode se apresentar como uma variável a ser analisada em função da eficiência fotodinâmica.

Em estudo *in vivo* realizado com ácido aminolevulínico (ALA) para o tratamento de lesões de pele de camundongos, Bissonnette e colaboradores¹⁰¹ utilizando exposições radiantemente de 12J/cm², 24J/cm² e 48J/cm² com irradiâncias de 5mW/cm², 20mW/cm² e 40mW/cm² observaram que a localização do dano dependeu da exposição radiante e da irradiância. Altas irradiâncias com baixas exposições radiantemente resultaram em dano localizado na parte superior da epiderme, enquanto baixas irradiâncias com altas exposições radiantemente levaram à

necrose completa da lesão. A distribuição do Fs (PpIX - protoporfirina IX) pela lesão foi caracterizada através da fluorescência, logo, os autores concluíram que os resultados obtidos não diferiram em função da concentração de Fs, mas sim, em função dos parâmetros de irradiação.

As exposições radiantes utilizadas em estudos de PDT antimicrobiana são avaliadas como medida de eficiência juntamente com a concentração de Fs, logo, uma alta taxa de redução microbiana com baixas exposições radiantes e baixas concentrações de Fs são características de um processo eficiente^{6, 11, 87}. Porém, a irradiância não é um fator levado em consideração uma vez que estudos realizados sobre os mesmos microorganismos (*E. coli* e *S. aureus*) utilizam irradiâncias que variam de 1,7mW/cm² à 400mW/cm².

Um dado interessante observado neste estudo é a diferente dinâmica apresentada pelos dois compostos (AT e AM), frente aos testes de parâmetros de irradiação. Enquanto o AT, apresenta um aumento da razão AD/AM, com perda máxima de absorção de 2,5% em relação à absorção inicial; o AM, apresenta diminuição da razão AD/AM, com queda máxima de absorção da ordem de 4%.

Conforme citado anteriormente, em sistemas biológicos, a presença de LPSs e proteínas aumenta a tendência de dimerização destes compostos fenotiazínicos^{61, 74, 100}. Vários estudos tentam explicar as diferenças entre estes fotossensibilizadores em relação à eficiência fotodinâmica^{11,14,70,74} e a tendência de dimerização do AT tem sido apontada como possível causa deste aumento de eficiência^{14, 61}. De acordo com os resultados observados neste estudo o AT poderia ser considerado mais estável frente à irradiação, possivelmente, pela manutenção de dímeros que seriam mais resistentes à degradação. Uma vez que a concentração, conforme observado neste estudo, é um fator decisivo para a dimerização do corante, uma queda na concentração de monômeros levaria à dissociação de dímeros o que geraria aumento de monômeros e diminuição de dímeros.

Sendo a relação AD/AM do AT mais estável e mais difícil de ser diminuída mesmo com quedas na concentração, este composto teria uma taxa de fotodegradação menor que a apresentada pelo AM. Porém, conforme já mencionado, esta relação em sistemas biológicos pode não ser reproduzida, uma vez que, as ERO formadas poderão interagir com outros reagentes, que não a molécula do Fs.

Outro fator a ser considerado na análise dos resultados apresentados é a forma de irradiação. A seguir serão apresentados os dados da fotodegradação de AM utilizando-se fonte não coerente de banda larga para a irradiação.

5.4.4 – Bandas de Irradiação

A FIG. 36 apresenta o resultado da comparação da irradiação realizada em solução aquosa de AM 30 μ M realizada com laser (λ =660nm), LED (λ =640nm $\pm$ 30nm) e LED mais filtro com baixa transmissão ($\approx$ 9%) em λ <620nm. As potências do laser e do LED foram ajustadas para 40mW e a do LED para 60mW nos ensaios com filtro para compensar a perda da potência total emitida pelo equipamento decorrente do uso do filtro.

Figura 36 - Espectros de absorção de solução aquosa de AM 30 μM inicial e após irradiação com laser e LED (180seg-40mW) e LED e filtro (180seg-50mW).

A FIG. 37 apresenta os espectros de emissão das soluções.

Figura 37 - Espectros de fluorescência de solução aquosa de AM 30 μ M inicial e após irradiação com laser e LED (180seg-40mW) e LED e filtro (180seg-50mW).

As FIG. 38 e 39 apresentam a relação AD/AM e absorção normalizada das soluções após irradiação.

Figura 38 - Razão da AD/AM calculada para as soluções de AM 30 μ M inicial e após irradiação com laser e LED (180seg-40mW) e LED e filtro (180seg-50mW).

Figura 39 - Absorção de dímeros e monômeros normalizada para as condições de laser e LED (180seg-40mW) e LED e filtro (180seg-50mW).

De acordo com os resultados apresentados, as mudanças nos espectros causadas pela irradiação com laser ou LED são as mesmas, porém, a intensidade

das alterações é maior com o emprego de banda larga. Mesmo a aplicação do filtro não alterou a diferença em relação ao laser. Sendo assim, a irradiação concomitante das bandas de monômeros e de dímeros não pode ser diretamente responsável por este fato, mas provavelmente a cobertura de toda a banda de absorção, poderia promover um aumento na magnitude dos efeitos observados.

Este resultado deve ser levado em consideração ao analisarmos a dinâmica de degradação do AT, que foi irradiado em todas as condições com LED. Uma vez que a fotodegradação do AM fica mais evidente com a utilização do LED, e este aumento não está relacionado com a irradiação da banda de dímeros, já que o resultado, com ou sem a utilização de filtro foi igual. De acordo com os resultados deste estudo, a hipótese de maior resistência do AT à degradação parece mais consistente.

As primeiras fontes de luz utilizadas para PDT foram fontes não coerentes. Fontes não coerentes têm um menor custo e são relativamente seguras para uso clínico. A vantagem do uso de fonte não coerente é que seu espectro de emissão pode ser ressonante com a absorção de vários fotossensibilizadores ¹⁰². As desvantagens do uso de fontes não coerentes seriam efeito térmico significativo, baixa intensidade e dificuldade de controle de parâmetros. LED são fontes emergentes para PDT, pois podem gerar altas exposições radiantes nos comprimentos de onda desejados sem significantes efeitos térmicos. Porém, as fontes mais comumente empregadas para aplicação clínica são lasers devido à facilidade de cálculo de parâmetros de irradiação, possibilidade do uso de fibras ópticas e aplicação mais precisa na área alvo.

Conforme discutido por Wong e colab , não é conhecida a diferença promovida nos resultados obtidos em PDT com o emprego de lasers ou de fontes de irradiação não coerentes. A dificuldade de caracterização de fontes de emissão branca é claramente apresentada nesse estudo onde uma lâmpada branca utilizada para PDT (PDT-1200[®] lamp) é descrita como tendo comprimento

de onda de emissão de $\lambda=560\text{nm}-780\text{nm}$ e a irradiância do equipamento foi ajustada para fornecer $80\text{mW}/\text{cm}^2$. Segundo os autores no comprimento de onda ressonante com a absorção do fotossensibilizador utilizado, a irradiância real foi de $20\text{mW}/\text{cm}^2$.

Sendo assim, é importante definir os papéis de ambas as bandas de absorção na eficiência fotodinâmica, segundo estudo anterior supramencionado, as duas principais bandas de absorção no visível teriam papel significativo na eficiência fotodinâmica, portanto, o uso de irradiação de banda larga seria mais eficiente além de apresentar menor custo operacional.

5.5 – EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA

5.5.1 – PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO

As FIG. 40 e 41 representam a intensidade do sinal e os valores transientes obtidos para a emissão de oxigênio singleto em solução de AM em dois solventes.

Figura 40 – Intensidade da emissão transiente do oxigênio singleto em $\lambda=1270\text{nm}$ em solução de AM $30\mu\text{M}$ nos solventes: água deionizada e solução salina 0,9%.

Figura 41 – Emissão transiente do oxigênio singleto em $\lambda = 1270\text{nm}$ em solução salina 0,9% e água deionizada.

A análise da emissão de oxigênio singleto demonstrou que em água há maior eficiência para produção desta molécula do que em solução salina 0,9%. Apesar dos baixos valores observados, a significância da diferença do sinal é considerada, uma vez que o mesmo capta apenas o final da emissão, devido ao tempo de resposta do detector.

Uma vez que os resultados anteriores demonstraram a tendência de dimerização do AM em solução salina, este resultado concorda com trabalhos anteriores^{25, 100}, que reportam a mudança do tipo de reação ocorrida para o AM quando há maior formação de dímeros, o que alteraria a reação de tipicamente tipo II para tipo I.

Conforme discutido anteriormente, as propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos corantes, são usualmente avaliadas nas espécies monoméricas. A maior agregação do corante promovida pelo solvente, somada a efeitos produzidos pela associação de microorganismos que representariam uma mudança no ambiente, poderia ser a responsável pela diminuição da efetividade

do AM frente a determinados microorganismos dependendo das condições em que o estudo for realizado.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, na comparação de resultados relativos à eficiência fotodinâmica, a variável solvente deve ser analisada, uma vez que a mesma pode interferir na agregação e na fotoquímica do corante.

5.5.2 – TESTES MICROBIOLÓGICOS

A FIG. 42 apresenta o gráfico da redução bacteriana obtida para a comparação de AM 30 μ M em solução salina 0,9% e água deionizada. A FIG. 43 apresenta a mesma comparação para o AT. Em ambos os casos a potência dos equipamentos (LED para AT e laser para AM) foi mantida em 40mW com tempo de exposição de 2 min (4,8J/cm² em uma área de 1cm²).

Figura 42 – Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos nas soluções de AM em água e em solução salina 0,9% (GCAAAM-Grupo controle ambiental AM água, GCASSAM- Grupo controle ambiental AM solução salina 0.9%, GTPISAM- Grupo tempo de pré-irradiação AM solução salina 0,9%, GTPIAAM- Grupo tempo de pré-irradiação AM água, GTAAM- Grupo tratamento água AM, GTSAM- Grupo tratamento solução salina 0,9% AM) .

Figura 43 – Redução bacteriana média e desvios padrão das soluções de AT em água e solução salina 0,9%. (GCAA-Grupo controle ambiental água, GCAS- Grupo controle ambiental solução salina 0.9%, GTPIAAT- Grupo tempo de pré-irradiação AT água, GTPISAT- Grupo tempo de pré-irradiação AT solução salina 0,9%, GTSSAT- Grupo tratamento solução salina 0,9% AT, GTAAT- Grupo tratamento água AT) .

A TAB. 6 apresenta o resultado das análises estatísticas efetuadas para a comparação entre os grupos bem como a redução bacteriana média para cada condição.

Tabela 6 – Valores da redução bacteriana para o teste de solventes com AM e AT. (GCAA-grupo controle ambiente água; GCASS-grupo controle ambiente solução salina 0,9%; GTPIA-grupo tempo de pré-irradiação água; GTPISS-grupo tempo de pré-irradiação solução salina 0,9%; GTA-grupo tratamento água; GTSS-grupo tratamento solução salina 0,9%)

Análise Efetuada	Redução	Valor de <i>p</i>
SOLVENTE AM - Laser		
GCAA X GTPIA	52%	0,47633
GCASS X GTPISS	40%	0,42040
GTPIA X GTA	99,84%	0,00015
GTPISS X GTSS	97,40%	0,00050
GTA X GTSS		0,15781
SOLVENTE AT - LED		
GCAA X GTPIA	67%	0,10926
GCASS X GTPISS	53%	0,21919
GTPIA X GTA	99,98%	0,00050
GTPISS X GTSS	97,08%	0,00370
GTA X GTSS		0,03205

Conforme pode ser observado na análise dos dados, a redução bacteriana média, foi maior nos grupos em que a água foi empregada como solvente, porém, somente com a utilização de AT houve diferença significativa entre os grupos estudados.

O melhor desempenho da água como solvente é explicado pelos resultados anteriores, uma vez que a água deionizada apresentou diferenças em relação à solução salina 0,9% na quantidade de oxigênio dissolvido, na agregação do corante, bem como, na produção de oxigênio singlete.

O fato de somente o AT ter apresentado diferença estatística em relação ao solvente deve-se provavelmente a maior tendência de dimerização do AT em relação ao AM conforme demonstrado neste estudo e em outros previamente realizados^{14,61, 74}. A maior dimerização ocorrida em solução salina, associada a dimerização promovida pela associação da solução com microorganismos promoveria um aumento da banda de dímeros de forma mais expressiva para o AT do que para o AM. Uma vez que, o LED utilizado para a irradiação do AT não apresentava características que permitissem a irradiação desta banda, um efeito fotodinâmico menos pronunciado poderia ser esperado.

Este resultado discorda da hipótese apresentada por alguns estudos^{14, 61}, que afirmam que a maior efetividade do AT em relação ao AM contra algumas espécies microbianas deve-se a maior tendência de dimerização deste composto. De acordo com o resultado obtido neste estudo a maior dimerização leva a menor efetividade, se a banda de absorção correspondente a dímeros não for eficientemente excitada, por outro lado, a dimerização protegeria o Fs da degradação promovida pela irradiação, logo, uma conjunção de fatores que ocorrem simultaneamente poderiam explicar a maior efetividade do AT.

A participação de dímeros no processo de fotossensibilização letal foi demonstrada em estudo anterior, aonde a irradiação somente da banda de dímeros superou a eficiência da banda de monômeros, quando dois comprimentos de onda, um correspondente a banda de dímeros e outro correspondente a banda de monômeros foram utilizados em concentrações de fotossensibilizador gradualmente aumentadas para promover aumento da banda de dímeros. Portanto, poderíamos inferir, de acordo com os resultados observados, e com aqueles reportados na literatura, que para obtenção de vantagens relativas ao processo de dimerização, a irradiação dos corantes deveria ser realizada com fontes de irradiação com capacidade para cobrir as principais bandas de absorção simultaneamente, conforme discutido anteriormente.

A FIG. 44 representa o gráfico da redução bacteriana obtida utilizando-se duas concentrações de corante 30 μ M e 300 μ M para o AT e a FIG. 45 apresenta as mesmas condições do estudo para o AM. As irradiações foram realizadas com 40mW por 2min (4,8J/cm² em uma área de 1cm²), feita com LED para o AT e com laser para o AM. A TAB. 7 apresenta os valores obtidos por meio da análise estatística e da análise da redução bacteriana média para a análise da variável concentração em relação à eficiência fotodinâmica.

Figura 44 – Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos com AT nas concentrações de 30 μ M e 300 μ M em água deionizada (GCAA-Grupo controle ambiental água, GTPI30-AT - Grupo tempo de pré-irradiação AT 30 μ M, GTPI300-AT- Grupo tempo de pré-irradiação AT 300 μ M, GT30-AT- Grupo tratamento 30 μ M, GT300-AT- Grupo tratamento 300 μ M).

Figura 45 – Redução bacteriana média e desvios padrão obtidos com AM nas concentrações de 30µM e 300µM em água deionizada (GCAA-Grupo controle ambiental água, GTPI30-AM - Grupo tempo de pré-irradiação AM 30µM, GTPI300-AM- Grupo tempo de pré-irradiação AM 300µM, GT30-AM- Grupo tratamento 30µM, GT300-AM- Grupo tratamento 300µM).

Tabela 7 – Valores da redução bacteriana para o teste de concentração com AM e AT. (GCA-grupo controle ambiente; GTPI30-grupo tempo de pré-irradiação na concentração de 30 μ M; GTPI300-grupo tempo de pré-irradiação na concentração de 300 μ M; GT30-grupo tratamento 30 μ M; GT300- grupo tratamento 300 μ M)

Análise Efetuada	Redução	Valor de <i>p</i>
CONCENTRAÇÃO AT		
GCA - AT X GTPI30 - AT	67%	0,31612
GCA - AT X GTPI300 - AT	93,43%	0,00784
GTPI30 – AT X GT30 - AT	99,99%	0,04488
GTPI300-AT X GT300- AT	100%	0,00016
GT30-AT X GT300 – AT		0,01161
CONCENTRAÇÃO AM		
GCA - AM X GTPI30 - AM	63,61%	0,53882
GCA - AM X GTPI300 – AM	99,74%	0,01947
GTPI30 – AM X GT30 – AM	99,87%	0,04636
GTPI300-AM X GT300- AM	100%	0,00219
GT30-AM X GT300 - AM		0,02064

A análise dos dados revelou que ambas concentrações foram efetivas para a redução bacteriana nas condições testadas. A toxicidade intrínseca dos corantes pôde ser observada através da diferença significativa entre o valor inicial e o valor obtido após o tempo de pré-irradiação para a concentração de 300 μ M.

A eficiência relativa da concentração de 300 μ M tanto para o AT como para o AM foi menor que a apresentada pela concentração de 30 μ M. A redução média da concentração de 300 μ M de AT em relação ao final do tempo de pré-irradiação foi de 3,5logs comparada a 4logs da concentração de 30 μ M. Para o AM a redução após o tempo de pré-irradiação para a concentração de 300 μ M foi de 2logs, enquanto a da concentração de 30 μ M foi de 3logs.

Como a eficácia da concentração de 300 μ M foi maior o uso de parâmetros sub-letais (diminuição do tempo de irradiação) que permitissem a contagem do número de colônias sobrevivente poderia ser útil, uma vez que a maior eficácia pode estar relacionada à toxicidade inerente ao corante e não há um efeito fotodinâmico. Trabalhos anteriormente publicados, relatam que o aumento da concentração não está diretamente relacionado ao aumento da eficiência. Bhatti e colaboradores , relatam que o aumento na concentração de AT de 12,5 μ g/mL (40 μ M) para 50 μ g/mL (163 μ M) mostrou piores resultados, atribuído pelos autores, a um possível efeito de barreira para a entrada de luz, promovido por altas concentrações de corante.

Também no trabalho de Williams e colaboradores ⁸⁹ a análise dos resultados revelou que a redução bacteriana obtida após a PDT seria mais dependente da exposição radiante utilizada do que da concentração empregada.

As FIG. 46 e 47 apresentam os gráficos da redução bacteriana obtida após a análise da irradiância como variável entre os grupos.

Figura 46 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de irradiância (LED) com AT 30 μ M em água (G1- Controle ambiental, G2AT-Tempo de pré-irradiação AT, G6 AT – 10mW por 5min, com energia de 3J e irradiância de 10mW/cm², G7 AT – 20mW por 2min 30s, com energia de 3J e irradiância de 20mW/cm², G8 AT – 40mW por 75s, com energia de 3J e irradiância de 40mW/cm²).

Figura 47 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de irradiância com AM. (G1- Controle ambiental, G2 AM-Tempo de pré-irradiação AM, G6 AM – 10mW por 5min, com energia de 3J e irradiância de 10mW/cm², G7 AM – 20mW por 2min 30s, com energia de 3J e irradiância de 20mW/cm², G8 AM – 40mW por 75s, com energia de 3J e irradiância de 40mW/cm²).

A TAB. 8 apresenta os resultados dos testes estatísticos e da redução bacteriana média obtida após o teste de irradiância.

Tabela 8 - Valores da redução bacteriana para o teste de irradiância com AM e AT. (G1-grupo controle ambiental; G2-grupo tempo de pré-irradiação(5min); G6-grupo tratamento 10mW-5min; G7- grupo tratamento 20mW-2min e 30s; G8-grupo tratamento 40mW-75s)

Análise Efetuada	Redução	Valor de p
IRRADIÂNCIA AM		
G1 X G2 AM	49,27%	0,19774
G2 AM X G6 AM	95,98%	0,03915
G2 AM X G7 AM	96,35%	0,02114
G2 AM X G8 AM	95,12%	0,04847
G6 AM X G7 AM		0,46734
G6 AM X G8 AM		0,32868
G7 AM X G8 AM		0,13247
IRRADIÂNCIA AT		
G1 X G2 AT	65,21%	0,18918
G2 AT X G6 AT	99,25%	0,00289
G2 AT X G7 AT	98,89%	0,01050
G2 AT X G8 AT	98,19%	0,01772
G6 AT X G7 AT		0,28806
G6 AT X G8 AT		0,04793
G7 AT X G8 AT		0,6813

A análise dos resultados revelou que todas as irradiâncias utilizadas foram efetivas para a redução bacteriana. Para o AM a maior redução média foi obtida com a potência de 20mW (20mW/cm²) (96,35%), porém, na comparação dos resultados com as demais potências empregadas, não foram detectadas diferenças significantes.

Para o AT a maior redução foi obtida com a potência de 10mW (99,25%), sendo que, a análise estatística revelou que o uso desta potência promoveu uma redução bacteriana significativamente maior do que a obtida com a potência de 40mW (98,19%). Em estudos realizados *in vivo*, a redução da irradiância leva ao aumento do efeito fotodinâmico para redução de tecidos neoplásicos, provavelmente por diminuição da hipóxia tecidual causada pelo aumento do consumo de O₂ nos tecidos^{20, 103, 104}.

Nas conclusões da pesquisa de Henderson e colaboradores¹⁰⁴ os autores destacam que a irradiância exerce grande controle sobre os resultados da terapia por meio do efeito modulatório sobre o consumo de oxigênio tecidual, bem como através de outros mecanismos ainda a serem identificados. Porém, para a aplicação da PDT antimicrobiana o efeito da irradiância ainda deve ser verificado, e os mecanismos envolvidos em uma possível diferença avaliados.

Os resultados deste estudo apontam para uma possível variância nos resultados relacionada à irradiância, com as menores potências utilizadas por maiores períodos de tempo apresentando melhores resultados, o consumo de O₂ também pode ser o responsável pelo resultado, uma vez que, maiores tempos de exposição permitiriam a troca de O₂ entre a amostra irradiada e o meio, se a tensão de O₂ se tornar reduzida na amostra.

As FIG. 48 e 49 apresentam os resultados obtidos nos testes microbiológicos para avaliação da influência do aumento da exposição radiante na fotossensibilização letal de *E. coli*. Foram aplicadas as energias de 2,4J, 4,8J e 9,6J com a irradiância fixa de 40mW/cm². As irradiações do AT foram executadas com LED e do AM com laser.

A TAB. 9 apresenta os valores da redução bacteriana média, bem como os resultados obtidos através da análise estatística para análise da exposição radiante.

Figura 48 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de exposição radiante com AT (G1-grupo controle ambiental; G2 AT -grupo tempo de pré-irradiação(5min); G3 AT -grupo tratamento energia de 2,4J e irradiância de 40mW/cm², G4 AT-grupo tratamento energia de 4,8J e irradiância de 40mW/cm²; G5 AT -grupo tratamento energia de 9,6J e irradiância de 40mW/cm²).

Figura 49 - Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de exposição radiante com AM. AM (G1-grupo controle ambiental; G2 AM -grupo tempo de pré-irradiação(5min); G3 AM -grupo tratamento energia de 2,4J e irradiância de 40mW/cm², G4 AM-grupo tratamento energia de 4,8J e irradiância de 40mW/cm²; G5 AM -grupo tratamento energia de 9,6J e irradiância de 40mW/cm²).

Tabela 9 - Valores da redução bacteriana para o teste de exposição radiante com AM e AT. (G1-grupo controle ambiental; G2-grupo tempo de pré-irradiação(5min); G3-grupo tratamento 40mW-1min; G4-grupo tratamento 40mW-2min; G5-grupo tratamento 40mW- 4min)

Análise Efetuada	Redução	Valor de <i>p</i>
EXPOSIÇÃO RADIANTE AM		
G1 X G2 AM	49,27%	0,19774
G2 AM X G3 AM	92,27%	0,36378
G2 AM X G4 AM	97,37%	0,01860
G2 AM X G5 AM	99,99%	0,00578
G3 AM X G4 AM		0,08751
G3 AM X G5 AM		0,03497
G4 AM X G5 AM		0,02543
EXPOSIÇÃO RADIANTE AT		
G1 X G2 AT	65,21%	0,18918
G2 AT X G3 AT	96,65%	0,03547
G2 AT X G4 AT	99,82%	0,01860
G2 AT X G5 AT	100%	0,00179
G3 AT X G4 AT		0,00815
G3 AT X G5 AT		0,00724
G4 AT X G5 AT		0,03608

Os resultados obtidos nos testes estatísticos revelam que o aumento do tempo de exposição está diretamente ligado com o incremento da taxa de morte celular obtida. Para o AT, todas as condições analisadas se mostraram estatisticamente significantes, enquanto que, para o AM, os tempos de 2min e 4min apresentaram as maiores diferenças.

Estes resultados concordam com trabalhos anteriores por demonstrarem a importância da exposição radiante para a obtenção dos efeitos desejados^{6, 11, 20, 92, 93}.

Os resultados deste estudo, bem como de estudos citados anteriormente, demonstram que a exposição radiante parece ser um dos fatores mais correlacionados com o efeito fotobactericida.

A FIG. 50 mostra a redução microbiana obtida após o tratamento dos grupos estudados com diferentes fontes de irradiação. Observa-se pelos resultados que mesmo possuindo menor potência relativa no comprimento de onda de absorção máxima (6,07mW em $\lambda=660\text{nm}$), a irradiação do AM (30 μM) com LED resulta na mesma redução bacteriana daquela obtida com laser.

Figura 50 – Redução bacteriana média e desvios padrão para o teste de AM com diferentes fontes de irradiação GCA-grupo controle ambiente; GTPI-grupo tempo de pré-irradiação; GTLA-grupo tratamento laser; GTLE-grupo tratamento LED; GTF-grupo tratamento LED e filtro)

A TAB. 10 apresenta os valores da redução bacteriana média, bem como os resultados obtidos através da análise estatística para avaliação do efeito das fontes de irradiação.

Tabela 10 - Valores da redução bacteriana para o teste de fontes de irradiação com AM. (GCA-grupo controle ambiente; GTPI-grupo tempo de pré-irradiação; GTLA-grupo tratamento laser; GTLE-grupo tratamento LED; GTF-grupo tratamento LED e filtro)

Análise Efetuada	Redução	Valor de <i>p</i>
Fonte de irradiação AM		
GCA X GTPI	63,34%	0,19030
GTPI X GTLA	99,85%	0,00489
GTPI X GTLE	99,95%	0,00463
GTPI X GTF	92,23%	0,00848
GTLA X GTLE		0,96400
GTLA X GTF		0,01940
GTLED X GTF		0,00848

Os resultados microbiológicos confirmam a importância da irradiação da banda de dímeros. A utilização do filtro que corta a emissão do LED na região de $\lambda = 610\text{nm}$ promoveu diferentes resultados daqueles obtidos com laser e LED sem o uso do filtro. Este resultado pode apresentar consequências para a aplicação clínica da PDT, uma vez que *in vivo* a presença de dímeros seria inevitável, portanto o papel das fontes de irradiação de banda larga pode ser importante na eficiência fotodinâmica.

Este resultado corrobora com os resultados do trabalho de Usacheva e colaboradores, que demonstraram a importância da irradiação das duas principais bandas de absorção. Como o LED tem menor potência na faixa de comprimentos

de onda entre $\lambda = 650\text{nm}$ a 670nm (aproximadamente 15% da emissão total) a eficiência igual do LED e laser só poderia ser explicada pela irradiação simultânea das bandas de absorção.

Vários fatores parecem influenciar a fotossensibilização letal *in vitro*. É esperado que *in vivo* fatores como microambiente, presença de biofilme organizado, localização dos microorganismos alvo e distribuição da luz afetem ainda mais os resultados obtidos. Portanto, uma cuidadosa análise e o controle prévio de variáveis conhecidas, que possam influenciar o resultado, devem ser executados antes do início do tratamento.

Neste contexto, este estudo demonstra que algumas condições controláveis como escolha do solvente, concentração do Fs e parâmetros de irradiação poderiam favorecer os resultados obtidos em estudos *in vivo*.

6 – Conclusões

Dos solventes utilizados em PDT antimicrobiana, a solução salina e a água deionizada apresentaram diferenças significantes. A quantidade de oxigênio dissolvido é maior em água deionizada do que em solução salina 0,9%. Em solução aquosa há menor agregação, maior formação de oxigênio singlete e maior redução microbiana.

A dinâmica de agregação dos corantes está relacionada com a concentração e solvente. Em altas concentrações há predominância de dímeros em relação a monômeros e este efeito é gradativamente revertido com a diminuição da concentração. O uso de solução salina a 0,9% e a 0,45% favorece a agregação dos fotossensibilizadores estudados.

A temperatura favorece a solubilização dos corantes quando altamente concentrados, em todos os solventes. Porém, seu efeito sobre baixas concentrações de corante, só pôde ser observado em solução salina.

A presença de saliva na solução promove efeito hipocrômico imediato, seguido de aumento da agregação do fotossensibilizador. Já a presença de soro de sangue causa desvio e alterações das bandas de absorção.

A fotodegradação dos corantes nas condições utilizadas neste estudo é baixa. Pelos resultados obtidos a proporção das alterações está relacionada com a exposição radiante e sua dinâmica com a irradiância. A fotodegradação do azul de metileno é mais evidente com o uso de fonte de banda larga para a irradiação.

A maior eficiência fotodinâmica foi observada com o uso de água deionizada como solvente, de concentrações de fotossensibilizador que

apresentaram menores razões da proporção de dímeros em relação a monômeros associados a baixas irradiâncias e maiores exposições radiantes. A utilização de fonte de irradiação de banda larga apresenta a maior eficiência fotodinâmica.

ANEXO A – Informações complementares.

1. Representação molecular do Azul de metileno e do Azul de toluidina.

AZUL DE METILENO

AZUL DE ORTO-TOLUIDINA

Fonte: www.sigma-aldrich.com

2. Coeficiente de partição (P) - **Partição água/octanol**

Água e octanol são imissíveis. A distribuição de um composto entre a água e o octanol, é usada para calcular o coeficiente de partição (log P) de uma molécula. A partição água/octanol é uma boa aproximação da distribuição de um composto entre a membrana lipídica e o citoplasma de sistemas celulares *in vivo*.

Em química orgânica a partição ou coeficiente de distribuição é a razão entre a concentração de um composto nas duas fases de uma mistura imissível (composto orgânico/água) no equilíbrio, portanto, esses coeficientes são a medida da diferença de solubilidade de um composto em dois solventes (hidrofóbico/hidrofílico). Logo, o coeficiente de partição mede o grau de lipofilicidade ou hidrofiliicidade de um soluto. O cálculo do coeficiente de partição é feito pela seguinte fórmula:

$$\log P_{\text{octanol} / \text{água}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{água} / \text{não-ionizada}}} \right), \text{ onde } \log P_{\text{octanol/água}} \text{ é o}$$

logarítmo do coeficiente de partição octanol/água, $[\text{solute}]_{\text{octanol}}$ é a concentração do soluto na fase octanol, $[\text{solute}]_{\text{água/não-ionizada}}$ é a concentração do soluto na fase aquosa. Logo, substâncias hidrofóbicas apresentam $\log P > 1$ e substâncias hidrofílicas apresentam $\log P < 1$.

Fonte: TAVARES LC. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v.27(4), p.631-639, 2004.

3 – Crescimento e Redução bacteriana

A reprodução bacteriana conforme explicado no item 3.3 (Aspectos microbiológicos relacionados à PDT antimicrobiana - p.20), se dá por bipartição. A velocidade de reprodução de bactérias em meio de cultura favorável é rápida, uma vez que o intervalo entre duas divisões sucessivas é da ordem de 20min.

Desta forma, teoricamente, uma bactéria pode produzir em 24h uma geração de alguns milhões de novos microorganismos, portanto, o crescimento e a ação antimicrobiana são analisados em escala logarítmica, sendo comum à contabilidade do número de logs (10 x) de redução.

Logo, uma redução de 7 logs, significa a redução de 10.000.000 de ufc/mL. Estas medidas são empregadas se o crescimento for analisado por concentração celular, ou seja, número de células por unidade de volume da cultura.

Fonte: MARTINIANO CRQ, MARTINIANO CR. ***Infecções em Odontologia***. 1.ed. São Paulo.S.P.: Ed Santos, 1999.

4 – Parâmetros de irradiação

Definição de termos – Termos correntemente utilizados em PDT.

As definições apresentadas a seguir seguem as recomendações da American Association of Physicists in Medicine (AAPM Report N° 57, Recommended Nomenclature for Physical Quantities in Medical Applications of Light AAPM 1996).

Energia radiante: Energia total emitida, transferida ou recebida como radiação eletromagnética. Unidade do Sistema Internacional (SI), J.

Potência radiante: Potência emitida, transferida ou recebida como radiação eletromagnética. SI - W.

Taxa de fluência: Razão entre a potência incidente em uma esfera infinitésima (contendo o ponto de interesse) e a seção- transversal da área da esfera. A unidade do SI é Wm^{-2} , porém a unidade mWcm^{-2} é mais comumente utilizada.

Fluência: Energia radiante total incidente em uma esfera infinitésima (contendo o ponto de interesse) dividida pela seção- transversal da área da esfera. A unidade do SI é Jm^{-2} , porém a unidade Jcm^{-2} é comumente empregada em PDT.

Irradiância: Potência radiante incidente em uma superfície infinitésima de um elemento (contendo o ponto de interesse) dividida pela área do elemento. A unidade do SI é Wm^{-2} , porém a unidade mWcm^{-2} é comumente utilizada em PDT.

A irradiância e a taxa de fluência possuem a mesma unidade (potência por área) porém elas não representam a mesma quantidade. A irradiância é definida para uma superfície particular enquanto a taxa de fluência pode ser definida e medida no espaço livre ou no interior de um objeto. Termos como densidade de potência e intensidade, que têm sido utilizados para descrever a irradiância, devem ser evitados.

Exposição radiante: Energia radiante incidente em uma superfície infinitésima de um elemento (contendo o ponto de interesse) dividida pela área do elemento. A unidade do SI é Jm^{-2} , porém a unidade Jcm^{-2} é comumente utilizada em PDT. A exposição radiante é a irradiância integrada no tempo. O termo densidade de energia deve ser evitado. Este termo é específico para irradiações de superfície.

Fontes: http://www.aapm.org/pubs/reports/rpt_57.pdf

http://www.aapm.org/pubs/reports/rpt_88.pdf

Referências Bibliográficas

- 1 - GAD F, ZAHRA T, HASAN T, HAMBLIN MR. Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bactéria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p.2173-2178, 2004.

- 2 - TUIE EM AND KELLY JM, Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 21, p.103-124, 1999.

- 3 - FINLAY JC, **Reflectance and Fluorescence Spectroscopies in Photodynamic Therapy**. 2003. Tese (Doutorado) - Department of Physics and Astronomy, University Of Rochester, New York.

- 4 - MARTIN JP AND LOGSDON N. The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *Escherichia coli* B. **J Biol Chem.**, v 262, n.15, p.7213-7219, 1987.

- 5 - WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemo.** v. 42, p.13-28, 1998.

- 6 - PHOENIX DA, SAYED Z, HUSSAIN S, HARRIS F, WAINWRIGHT M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 17-22, 2003.

- 7 - TEGOS GP, HAMBLIN MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50 p.196-203, 2006.

- 8 - YOSHIKAWA TT. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? **J. Am. Geriatr. Soc.**, v.50, p. S:226-S229, 2002.

- 9 - HAMBLIN MR AND HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.3, p. 436-450, 2004.

-
- 10 - SILVA DFT, VIDAL BC, ZEZELL DM, ZORN TMT, NÚÑEZ SC, RIBEIRO MS. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. **J. Biomed. Opt.** , v.11, p.024002, 2006.
- 11 - USACHEVA MN, TEICHERT MC, BIEL MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganism. **Lasers Surg. and Med.**; v.29, p. 165-173, 2001.
- 12 - DE SOUZA SC, JUNQUEIRA JC, BALDUCCI I, KOGA-ITO CY, MUNIN E, JORGE AOC. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 83, p.34-38, 2006.
- 13 - WAINWRIGHT M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.21, p. 510-520, 2003.
- 14 - 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: Biol.** ,v.71, p.87-98, 2003.
- 15 -SAVINO F, MACCARIO S, GUIDI C, CASTAGNO E, FARINASSO D, CRESI F, SILVESTRO L, MUSSA GC. Methemoglobinemia caused by the ingestion of courgette soup given in order to resolve constipation in two formula-fed infants. **Ann. Nutr. Metab.**, v.50, p.368-371,2006.
- 16 - BETTEN DP, VOHRA RB, COOK MD, MATTEUCCI MJ, CLARK RF. Antidote use in the critically ill poisoned patient. **J. Intensive. Care Med.**, v.21, p.255-277,2006.
- 17 - GOLSHAN M AND NAKHLIS F. Can methylene blue only be used in sentinel lymph node biopsy for breast cancer? **Breast J.**,v.12, p.428-430, 2006.
- 18 - MARTINIANO CRQ, MARTINIANO CR. **Infecções em Odontologia**. 1.ed. São Paulo.S.P.: Ed Santos, 1999.
- 19 - MALIK Z, LADAN H, NITZAN Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Photochem. Photobiol. B.: Biol.**, v. 14, p. 262-266, 1992.

-
- 20 - WONG TW, WANG YY, SHEU HM, CHUANG YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p.895-902, 2005.
- 21 - MAESTRIN APJ, RIBEIRO AO, TEDESCO AC, NERI CR, VINHADO FS, SERRA OA, MARTINS PR, IAMAMOTO Y, SILVA AMG, TOMÉ AC, NEVES MGPMS, CAVALEIRO JAS. A novel chlorin derivative of meso-tris (pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: Synthesis, photophysical and photochemical properties. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.15, p.1-8, 2004.
- 22 - TUI TE EM AND KELLY JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.21, p. 103-124, 1999.
- 23 - REIS ER. **Glândula Harderiana de ratos Wistar como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos**. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, São Paulo.
- 24 - FERREIRA J, MORIYAMA T, KURACHI C, DE CASTRO E SILVA O, SIBATA C, BAGNATO VS. Photobleaching of Photogen®: A spectroscopic study in solution. **Proceed. Spie**, v. 5689, p.227-234, 2005.
- 25 - SEVERINO D, JUNQUEIRA HC, GUGLIOTTI M, GABRIELLI DS, BAPTISTA MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochem. Photobiol.**, v.77, p.459-468, 2003.
- 26 - SHACKLEY DC, WHITEHURST C, CLARKE NW, BETTS C, MOORE JV. Photodynamic Therapy. **J. R. Soc. Med.**, v. 92, p.562-565, 1999.
- 27 - REDMOND RW, KOCHVAR IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.**, v. 82, p.1178-1186, 2006.
- 28 - WAINWRIGHT M. Non-porphyrin photosensitizers in Biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, p. 351-358, 1996.
- 29 - GROSSWEINER LI. Photodynamic therapy. **J. Laser Appl.**, v.7, p.51-57, 1995.

-
- 30 - QUEBEDEAUX B, HAVELKA UD, LIVAK KL, HARDY RWF. Effect of altered pO_2 in the aerial part of soybean on syAMiotic nitrogen fixation. **Plant. Physiol.**, v.56, p.761-764, 1975.
- 31 - COOPER PD, BURT AM, WILSON JN. Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. **Nature**, v.182, p.1508-1509, 1958.
- 32 - FARR SB, KOGOMA T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n.4, p. 561-585,1991.
- 33 - FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.
- 34 - WARDMAN P. Free radicals: nature's way of saying NO or molecular murder. Gray Lab Can Res. pp 1:12, disponível on-line:
<http://www.gci.ac.uk/lab/reviews/pwrev.html> >. Acesso em: 05 dez. 2006.
- 35 - BURCH PA. **DNA damage and cell lethality by photodynamically produced oxygen radicals**. Tese (Doutorado). Rice University, Houston, Texas, 1989.
- 36 - FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: A radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p.1203-1209, 1998.
- 37 - MATTOS IL, SHIRAISHI KA, BRAZ AD, FERNANDES JR. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Quim. Nova**, v.26, n.3, p.373-380,2003.
- 38 - KONAT GW. H_2O_2 -induced higher order chromatin degradation. A novel mechanism of oxidative genotoxicity. **J. Biosci.**, v.28, n.1, p.57-60, 2003.
- 39 - KIM NH AND KANG JH. Oxidative damage of DNA induced by the cytochrome c and hydrogen peroxide system. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.39, n.4, p.452-456, 2006.

-
- 40 - HOEPELMAN IM, BEZEMER WA, VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE, MARX JJM, VERHOEF J. Bacterial Iron enhances oxygen radical-mediated killing of *Staphylococcus aureus* by phagocytes. **Infect. Immun.**, v.58, n.1, p.26-31, 1990.
- 41 - RHEE SG, CHANG T-S, BAE YS, LEE S-R, KANG SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.14, p.S211-S215, 2003.
- 42 - SCANDALIOS JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.38, p. 995-1014, 2005.
- 43 - HASAN N, ALI I, NASEEM I. Photodynamic inactivation of trypsin by the aminophylline-riboflavin system: involvement of hydroxyl radical. **Med. Sci. Monit.**, v.12, n.8, p.283-289, 2006.
- 44 - TAKESHITA K, OLEA-AZAR CA, MIZUNO M, OZAWA T. Singlet oxygen-dependent hydroxyl radical formation during uroporphyrin-mediated photosensitization in the presence of NADPH. **Antioxid. Redox Signal**, v.2, n.2, p.355-362, 2000.
- 45 - NISHIZAWA C, TAKESHITA K, UEDA J, MIZUNO M, SUZULI KT, OZAWA T. Hydroxyl radical generation caused by the reaction of singlet oxygen with a spin trap, DMPO, increases significantly in the presence of biological reductants. **Free Radic. Res.**, v.38, n.4, p.385-392, 2004.
- 46 - DEVASAGAYAM TPA, TILAK JC, BOLOOR KK, SANE KS, GHASKADBI SS, LELE RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India**, v.52, p.794-804, 2004.
- 47 - HULL DS. Oxygen free radicals and corneal endothelium. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, v.88. p.463-511, 1990.
- 48 - WARING WS. Uric Acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. **Q. J. Med.**, v.95, p.691-693, 2002.

-
- 49 - BALASUBRAMANIAN B, POGOZELSKI WK, TULLIUS TD. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.95, n.17, p.9738-9743, 1998.
- 50 - PRYOR WA. Why is the hydroxyl radical the only that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high eletrophilicity, high thermochemical reactivity and a mode of production that occurs near DNA. **Free Radic. Biol. Med.**, v.4, n.4, p.219-223, 1988.
- 51 - KIM SY, KIM EJ, PARK J-W. Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.35, n.4, p.353-357, 2002.
- 52 - JARVI MT, NIEDRE MJ, PATTERSON MS, WILSON BC. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: Current status, challenges and future prospects. **Photochem. Photobiol.**, v.82, p.1198-1210, 2006.
- 53 - OTSU K, SATO K, IKEDA Y, IMA H, NAKAGAWA Y, OHBA Y, FUJI IJ. An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the supresión of caspase activation. **Biochem. J.**, v. 389, p.197-206, 2005.
- 54 - SKOVSEN E, SNYDER JW, LAMBERT JDC, OGILBY PR. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. **J. Phys. Chem. B.**, v.109, n.18, p.8570-8573, 2005.
- 55 - MIYAMOTO S, MARTINEZ GR, RETTORI D, AUGUSTO O, MEDEIROS MHG, DI MASCIO P. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.103, n.2, p.293-298, 2006.
- 56 - MARTINIANO CR, MARTINIANO CRQ. **Infecções em Odontologia**. 1.ed. São Paulo, S.P.: Ed Santos, 1999.
- 57 - BIER O. **Microbiologia e Imunologia** . 30. ed. São Paulo, S.P.: Comp. Melhoramentos de São Paulo, 1994.

58 - Microbiologia oral. Disponível on-line:

www.microbiologiaonline.com.br.> Acesso em : 15 ago. 2005.

59 - MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? ***Lasers Med. Sci.***, v.22, p.83-91, 2007.

60 - MALIK Z, LADAN H, NITZAN Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. ***J. Photochem. Photobiol. B: Biol.***, v.14, p.262-266, 1992.

61 - USACHEVA MN, TEICHERT MC, BIEL MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. ***Lasers Surg. Med.***, v.33. p.311-319, 2003.

62 - FAHEY RC, BROWN WC, ADAMS WB, WORSHAM MB. Occurrence of glutathione in bacteria. ***J. Bacteriol.***, v.133, n.3, p.1126-1129, 1978.

63 - BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. ***Annals Bot.***, v.91, p.79-194, 2003.

64 - GOSWANI M, MANGOLI SH, JAWALI N. Involvement of reactive oxygen species in the action of Ciprofloxacin against Escherichia coli. ***Antimicrob. Agents Chemother.***, v.50, n.3, p.949-954, 2006.

65 - NYSTRÖM T. Stationary-Phase Physiology. ***Annu. Rev. Microbiol.***, v.58, p.161-181, 2004.

66 - NYSTRÖM T. The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic. ***Cell Mol. Life Sci.***, v.60, p.1333-1341, 2003.

67 - WAINWRIGHT M, CROSSLEY KB. Photosensitising agents-circumventing resistance and breakdown biofilms: a review. ***Int. Biodet. Biodeg.***, v.53, p.119-126, 2004.

68 - LEWIS K. Riddle of biofilm resistance. ***Antimicrob. Agents Chemother.***, v.45, n.4, p.999-1007, 2001.

-
- 69 - SCHULTZ EW, KRUEGER AP. Inactivation of staphylococcus bacteriophage by methylene blue. **Proced. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.26, p.100-101, 1928; *apud* WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v.42, p.13-28, 1998.
- 70 - DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. Photodynamic inactivation of *Bacillus* Spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.6918-6925, 2005.
- 71 - WAINWRIGHT M, PHOENIX DA, MARLAND J, WAREING DRA, BOLTON FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, v.19, p.75-80, 1997.
- 72 - WILSON M, DOBSON J, SARKAR S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.8, p.182-187, 1993.
- 73 - BERGERON JA AND SINGER M. Metachromasy: An experimental and theoretical reevaluation. **J. Biophysic Biochem. Cytol.**, v.4, n.4, p.433-457, 1958.
- 74 - USACHEVA MN, TEICHERT MC, SIEVERT CE, BIEL MA. Effect of Ca^{2+} on the photobactericidal efficacy of methylene blue and toluidine blue against Gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides. **Lasers Surg. Med.**, v.38. p.946-954, 2006.
- 75 - MANG TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiag. Photodynam. Ther.**, v.1, p.43-48, 2004.
- 76 - MATEVSKI D, WEERSINK R, TENENBAUM HC, WILSON B, ELLEN RP, LÉPINE G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro*. **J. Periodont. Res.**, v.38, p.428-435, 2003.
- 77 - CHAN Y E LAI C-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v.18, p.51-55, 2003.

-
- 78 - DESIMONE NA, CHRISTIANSEN C, DORE D. Bactericidal effect of 0,95mW Helium-Neon and 5mW Indium-Gallium-Aluminum-Phosphate laser irradiation at exposure times of 30,60, and 120 seconds on photosensitized *Staphulococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* *In vitro*. **Phys. Ther.**, v.79, n.9, p.839-846, 1999.
- 79 - METCALF D, ROBINSON C, DEVINE D, WOOS S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.58, p.190-192, 2006.
- 80 - MPHIL MA, STRINGER MR, CRUSE-SAWYER JE, BROWN SB. Fluence-rate effects upon *m*-THPC photobleaching in a formalin-fixed cell system. **Photodiag. Photodynam. Ther.**, v.1, p.173-180, 2004.
- 81 - ERICSON MB, GRAPENGIESSER S, GUDMUNDSON F, WENNBERG A-M, LARKO O, MOAN J, ROSÉN A. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. **Lasers Med. Sci.**, v.18, p.56-62, 2003.
- 82 - MILLSON CE, WILSON M, MACROBERT AJ, BEDWELL J, BOWN SG. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.245-252, 1996.
- 83 - SOUKOS NS, WILSON M, BURNS T, SPEIGHT P. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluates in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.18, p.253-259, 1996.
- 84 - KÖMERIK N, WILSON M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **J. Appl. Microbiol.**, v.92, p.618-623, 2002.
- 85 - Dissolved Oxygen. Disponível on-line: <http://omp.gso.uri.edu/doee/science/physical/choxy1.htm>.> Acesso em 20 jun 2007.
- 86 - MARTINEZ LA, MARTINEZ CG, KLOPOTEK BB, LANG J, NEUNER A, BRAUN A, OLIVEROS E. Nonradiative and radiative deactivation of singlet

molecular oxygen ($O_2(a^1\Delta_g)$) in micelar media and microemulsions. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.58, p.94-107, 2000.

87 - DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.2329-2335, 2005.

88 - KOMERIK N, NAKANISHI H, MACROBERT AJ, HENDERSON B, SPEIGHT P, WILSON M. In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, p.932-940, 2003.

89 - WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection (PAD) used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **J. Dentis.**, v.34. p.363-371, 2006.

90 - IMPERT O, KATAFIAS A, KITA P, MILLS A, PIETKIEWICZ-GRACZYK A, WRZESZCZ G. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)–halide species in acidic aqueous media. **J. Royal Soc. Chem.**, p.348-353, 2003.

91 - GAD F, ZAHRA T, HASAN T, HAMBLIN MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.2173-2178, 2004.

92 - ZEINA B, GREENMAN J, CORRY D, PURCELL WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vivo*. **Br. J. Dermatol.**, v.146, p.568-573, 2002.

93 - 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.**, v.18, p.253-259, 1996.

94 - TYYSTJÄRVI E, KOSKI A, KERÄNEN M, NEVALAINEN O. The Kautsky curve is a built-in barcode. **Biophys. J.**, v.77, p.1159-1167, 1999.

-
- 95 - ZHANG LZ, TANG G-Q. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.74, p.119-125, 2004.
- 96 - BHATTI M, MACROBERT A, MEGHJI S, HENDERSON B, WILSON M. Effects of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **Photochem. Photobiol.**, v.65, p.1026-1031, 1997.
- 97 - ESTEVAM MC, NASCIMENTO OR, BAPTISTA MS, DI MASCIO P, PRADO FM, FALJONI-ALACIO A, ZUCCHI M, NANTES IC. Changes in the spin state and reactivity of cytochrome c induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.38, p.39214-39222.
- 98 - PERUZZO TM, DO CANTO EL. **Química na abordagem do cotidiano**. 1.ed., São Paulo, S.P.: Editora Moderna, 1996.
- 99 - JONNALAGADDA SB E GOLLAPALLI NR. Kinetics of reduction of toluidine blue with sulfite- Kinetic salt effect in elucidation of mechanism. **J. Chem. Edu.**, v.77, n.4, p.506-509, 2000.
- 100 - JUNQUEIRA HC, SEVERINO D, DIAS LG, GUGLIOTTI MS E BAPTISTA MS. Modulation of methylene blue photochemical properties base don adsorption at aqueous micelle interfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.4, p.2320-2328, 2002.
- 101 - BISSONNETTE R, SHARFAI S, VIAU G, LIU Y. Irradiance and light dose influence histological localization of photodamage induced by photodynamic therapy with aminolaevulinic acid. **Br. J. Dermatol.**, v.151, n.3, p.653-655, 2004.
- 102 - HUANG Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technol. Cancer Res. Treat.**, v.4, p.283-293, 2005.
- 103 - HENDERSON BW, GOLLNICK SO, SNYDER JW, BUSCH TM, KOUSIS PC, CHENEY RT, MORGAN J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen

determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. **Cancer Res.**, v.64, n.6, p.2120-2126, 2004.

104 - HENDERSON BW, BUSH TM AND SNYDER JW. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. **Lasers Surg. Med.**, v.38,n.5, p.489-493, 2006.