

MICHELLE PENELUPPI SILVA

TERAPIA FOTODINÂMICA EM ESPOROS DE *Bacillus atropheus* E *Bacillus subtilis*: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita



2012

MICHELLE PENELUPPI SILVA

**TERAPIA FOTODINÂMICA EM ESPOROS DE *Bacillus atrophaeus* e
Bacillus subtilis: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa
bengala e verde malaquita**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

S38t Silva, Michelle Peneluppi.

Terapia fotodinâmica em esporos de bacillus atrophaeus e bacillus subtilis: estudos com laser, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita / Michelle Peneluppi Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
104 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

Orientador: Prof. Antonio Olavo Cardoso Jorge

1. Terapia fotodinâmica. 2. Esporos de Bacillus Atrophaeus. 3. Esporos de Bacillus subtilis. 4. Fontes de luz. 5. Fotossensibilizadores. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 30 de julho de 2012.

Assinatura:

E-mail: michelle.silva@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Universidade de São Paulo

São José dos Campos, 30 de julho de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Doralice e Aparício, por todo carinho, dedicação e apoio durante todos os momentos de minha vida.

Ao meu amado esposo, Carlos Eduardo, luz de minha vida, por seu amor, compreensão e companheirismo. Meu eterno amor e grande amigo.

Aos meus queridos animais, amores de minha vida. Amor verdadeiro, único e especial. Anjos que iluminam minha vida e tornam minha caminhada mais doce e tranquila.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, meu sincero e eterno agradecimento por acreditar em mim e, assim, tornar possível a realização de um grande sonho: meu ingresso na área acadêmica.

Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e oportunidade. Toda minha admiração ao profissional e pessoa que representa.

À querida Professora Adjunta Juliana Campos Junqueira pela dedicação, amizade e conhecimentos transmitidos com tanto carinho. Obrigada por contribuir na minha nova caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos, concedendo a oportunidade da realização de mais um lindo sonho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na coordenação de Profa. Adj. Cristiane Yumi koga Ito e Prof. Adj. Mari Eli Leonelli de Moraes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida (processo 2010/14434-4).

Ao Carlos Alberto Guedes, sempre solícito, obrigada pela paciência e cooperação.

Aos secretários da Seção de Pós-graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka pela colaboração e disponibilidade.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À querida Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão, pessoa tão meiga e sábia, que participou do meu exame de qualificação, contribuindo e

enriquecendo a elaboração da minha dissertação. Meus eternos agradecimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, amigos essenciais para concretização da minha pesquisa. Obrigada.

À toda a equipe da biblioteca pela auxílio prestado sempre que necessário e solicitado.

Às minhas amigas, Elisabete Piva e Adeline Lacerda Jorjão, pela amizade e pelas palavras de incentivo.

Às amigas, Cristiane Aparecida Pereira Correia, Anna Carolina Borges Pereira da Costa e Simone Furgeri Godinho Vilela meus sinceros agradecimentos pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração.

À todos os colegas do laboratório Jéssica Diane dos Santos, Jonatas Rafael de Oliveira, Rodnei Dennis Rossoni, Patrícia Pimentel de Barros, Bruno Mello de Matos, Fernanda Malagutti Tomé Matsumoto, José Chibebe Junior, Júnia Oliveira Barbosa, Lirian Silva de Figueiredo Freitas, Vanessa Maria de Campos Rasteiro e aos demais colegas pela amizade.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram e ajudaram a concretizar minha dissertação. Obrigada.

*São precisamente as perguntas para as quais não
existem respostas que marcam os limites das
possibilidades humanas e traçam as fronteiras da
nossa existência.*

Milan Kundera

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 História da Terapia Fotodinâmica	15
2.2 Terapia Fotodinâmica	16
2.2.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	18
2.3 Oxigênio singlete.....	19
2.4 Fotossensibilizador	20
2.4.1 Azul de Metileno.....	21
2.4.2 Rosa Bengala.....	21
2.4.3 Verde Malaquita	22
2.5 Irradiação	23
2.5.1 LASER.....	23
2.6 <i>Bacillus</i> spp.	25
2.6.1 Esporos de <i>Bacillus</i> spp.	26
2.6.2 <i>Bacillus atrophaeus</i>	30
2.6.3 <i>Bacillus subtilis</i>	31
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Preparo da suspensão dos esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	34
4.2 Método de coloração de Wirtz-Conklin.....	35
4.3 Terapia Fotodinâmica	35
4.4 Fotossensibilização in vitro.....	36
5 RESULTADOS	38

5.1 Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>: Azul de Metileno e LASER.....	38
5.1.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	39
5.1.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	40
5.1.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	41
5.2 Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>: Rosa Bengala e LED	42
5.2.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	42
5.2.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	43
5.2.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	44
5.3 Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>: Verde Malaquita e LASER	45
5.3.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	45
5.3.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	46
5.3.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	47
5.4 Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>: Comparativo geral	48
5.5 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>: Azul de Metileno e LASER	49
5.5.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	49
5.5.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	50
5.5.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	51
5.6 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>: Rosa Bengala e LED	52
5.6.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	52
5.6.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	53
5.6.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	54
5.7 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>: Verde Malaquita e LASER	55
5.7.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos.....	55
5.7.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos.....	56
5.7.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos.....	57
5.8 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>: Comparativo geral	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A.....	87
APÊNDICE B.....	90

APÊNDICE C	93
APÊNDICE D	96
APÊNDICE E	99
APÊNDICE F	102

Silva MP. Terapia fotodinâmica em esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*: estudos com LASER, LED, azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

Os esporos de *Bacillus* spp. são encontrados amplamente distribuídos na natureza, podendo ocasionar contaminação do meio ambiente e, eventualmente, doenças ao homem e animais. Em resposta a crescente resistência microbiana, a terapia fotodinâmica (PDT) surge para atuar como um tratamento alternativo e eficaz. O presente estudo teve como objetivo comparar e avaliar a ação exercida pelo LASER de baixa intensidade (vermelho visível) e pelo diodo emissor de luz verde (LED) em esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* na PDT, com o uso dos fotossensibilizadores azul de metileno (37,5 µM), rosa bengala (12,5 µM) e verde malaquita (300 µM). Utilizou-se cepa padrão de *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659). As cepas foram cultivadas, durante 7 dias, em Ágar Nutriente acrescidas de 0,003% de sulfato de manganês e analisadas quanto a formação de esporos (coloração de Wirtz-Conklin). Os esporos foram suspensos em água destilada esterilizada e centrifugados por 10 min a 653 Xg. As suspensões receberam choque térmico de 70 °C por 30 min. As suspensões foram padronizadas com 10⁶ células/mL. Em placas de 96 poços adicionou-se 0,1 mL de suspensão dos esporos de *Bacillus atrophaeus* ou de *Bacillus subtilis* e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de solução de NaCl a 0,9%, sendo agitadas durante 5, 10 e 30 minutos e irradiadas. Realizaram-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em placas com Ágar Infusão Cérebro-Coração e incubadas a 37 °C por 48 horas. Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA, teste de Tukey, p<0,05). As maiores reduções observadas em UFC/mL (Log₁₀) para os esporos de *Bacillus atrophaeus* foram 0,71 Log₁₀ para azul de metileno (10 min); 2,49 Log₁₀ para rosa bengala (30 min) e 0,42 Log₁₀ para verde malaquita (10 min). Em relação aos esporos de *Bacillus subtilis* as maiores reduções foram 0,82 Log₁₀ para azul de metileno (10 min); 3,86 Log₁₀ para rosa bengala (30 min) e 0,63 Log₁₀ para verde malaquita (10 min). Conclui-se que a PDT foi eficaz contra esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* nos parâmetros testados.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Esporos de *Bacillus atrophaeus*. Esporos de *Bacillus subtilis*. Fontes de luz. Fotossensibilizadores.

Silva MP. *Photodynamic therapy of spores of Bacillus atrophaeus and Bacillus subtilis: studies with laser, LED, methylene blue, rose bengal and malachite green [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.*

ABSTRACT

The spores of Bacillus spp. are found widely distributed in nature, which may cause contamination of the environment and eventually diseases to humans and animals. In response to increasing microbial resistance, photodynamic therapy (PDT) appears to act as an alternative treatment and effective. The present study aimed to compare and evaluate the action exerted by low intensity laser and green light emitting diode (LED) in spores of Bacillus atrophaeus and Bacillus subtilis in PDT, with the use of photosensitizers blue methylene (37.5 μM), rose bengal (12.5 μM) and malachite green (300 μM). It was used a standard strain of Bacillus atrophaeus (ATCC 9372) and Bacillus subtilis (ATCC 19659). The strains were cultivated for 7 days in Nutrient Agar added to 0.003% of manganese sulphate and analyzed for the formation of spores (Wirtz-Conklin staining). The spores were suspended in sterile distilled water and centrifuged for 10 min at 653 Xg. The suspensions were heat shock at 70 °C for 30 min. The suspensions were standardized to 10^6 cells / mL. In 96-well plates were added 0.1 ml of Bacillus subtilis or Bacillus atrophaeus and 0.1 ml of the photosensitizer or NaCl 0.9%, stirred for 5, 10 and 30 minutes and irradiated. Serial dilutions were performed. Aliquots of 0.1 mL of the dilutions were plated on Brain Heart Infusion Agar and incubated at 37 °C for 48 hours. The results were analyzed statistically (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). The highest observed reductions in CFU/ml (Log_{10}) for Bacillus atrophaeus were 0.71 Log_{10} for methylene blue (10 minutes), 2.49 Log_{10} for rose bengal (30 min) and 0.42 Log_{10} for malachite green (10 min). In relation to Bacillus subtilis the largest reductions were 0.82 Log_{10} for methylene blue (10 minutes), 3.86 Log_{10} for rose bengal (30 min) and 0.63 Log_{10} for malachite green (10 min). The conclusion was that the PDT was effective against Bacillus subtilis and Bacillus atrophaeus the parameters tested.

Keywords: Photodynamic Therapy. Spores of Bacillus atrophaeus. Spores of Bacillus subtilis. Light sources. Photosensitizers.

1 INTRODUÇÃO

Vivemos em uma época de expansão tecnológica e científica, na qual há uma crescente conscientização sobre a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos, ocasionando uma constante busca pelo desenvolvimento de tratamentos alternativos e/ou coadjuvantes. Assim, mediante esta resistência ocasionada, principalmente, pelo uso frequente e indevido dos antimicrobianos, limitando a eficiência dos tratamentos convencionais, a Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês, *Photodynamic Therapy*) surge como uma modalidade terapêutica adjuvante para contribuir no desenvolvimento do controle de micro-organismos.

Porém, a terapia fotodinâmica não deve ser entendida como uma substituição aos tratamentos convencionais e seus fármacos, mas como tratamento complementar e eficaz para algumas situações (Garcez et al., 2003). O mecanismo da terapia fotodinâmica constitui-se na combinação de um fotossensibilizador, uma luz e moléculas de oxigênio para efetuar a destruição de um alvo biológico (Dougherty et al., 1998).

Quando os nutrientes são limitados, as bactérias do gênero *Bacillus* formam esporos, metabolicamente inativos, que são extremamente resistentes às agressões ambientais e substâncias químicas tóxicas que facilmente destruiriam os seus homólogos celulares (Russell, 1990; McDonnell, Russell, 1999; Nicholson et al., 2000).

Com a resistência dos micro-organismos, os esporos, formados por algumas bactérias tornam-se, também, mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos. Segundo Oliveira et al. (2009), esses micro-organismos estão assumindo importância relevante, principalmente, nas

questões relacionadas com condições sanitárias devido aos dejetos descartados no meio ambiente, como resíduos fecais. Distribuídos amplamente na natureza, os esporos causam deterioração nos alimentos e eventualmente doenças ao ser humano.

Outra preocupação relevante é a disponibilidade de água potável, ou pelo menos útil, para consumo da população. Uma possibilidade para solucionar este problema é a necessidade de purificar a água para que possa ser reutilizada, eliminando os resíduos nela existentes. Neste caso, os esporos, bem como outros micro-organismos patológicos constituem um sério risco à saúde da população. Embora o cloro seja eficaz na inativação de bactérias e vírus, a formação de subprodutos potencialmente tóxicos e cancerígenos é uma questão que desencadeia o interesse por tratamentos alternativos (Schäfer et al., 2000).

Uma variedade de agentes biológicos pode estar presente em um acidente biológico ou num ataque de bioterrorismo. Consequentemente, existe uma necessidade por tratamentos mais fáceis de serem utilizados e que possam destruir estes micro-organismos. Conforme descrito na História, os esporos de *Bacillus anthracis* foram utilizados como verdadeiras armas biológicas, pois os esporos de *Bacillus* spp. são metabolicamente inativos e resistentes a muitos tratamentos que destroem micro-organismos na forma vegetativa, incluindo produtos químicos, radiação ultravioleta e calor seco e úmido (Russell, 1990; McDonnell, Russell, 1999; Nicholson et al., 2000; Setlow et al., 2000). Devido ao alto nível de resistência, o teste de descontaminação mais eficaz é aquele que tem a capacidade de destruir esporos (Young, Setlow, 2004).

Assim, torna-se importante e essencial o surgimento de pesquisas para avaliar a ação da terapia fotodinâmica em esporos bacterianos com intuito de descobrir métodos mais eficazes para a destruição destas formas de resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da Terapia Fotodinâmica

Relatos da terapia fotodinâmica foram datados da época da civilização egípcia por meio da ingestão de plantas (contendo os psoralenos, furo [3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofurano-acrílico δ -lactona) e luz solar, para tratamento de doenças como vitiligo (Simplício et al., 2002) e psoríase. Relatos antigos encontrados na Índia e China também descrevem a utilização da PDT (Simplício et al., 2002; Ochsner, 1997b). Em 1900, Oscar Raab, na Universidade Ludwig-Maximilian, Munique, descreveu a ação letal do corante acridina e da luz sobre *Paramecio*, organismo unicelular causador da malária (Sternberg, Dolphin, 1998; Kübler et al., 2001; Pervaiz, 2001; Malik et al., 2010; Imparato, 2005).

O médico alemão Friedrich Meyer-Betz foi pioneiro no desenvolvimento de estudos sobre “Fototerapia de Irradiação” (PRT, do inglês, *Photo Radiation Therapy*) com porfirina, em 1913, observando os efeitos da PRT-hematoporfirina em sua pele pela inoculação de 200 mg de hematoporfirina e não obteve efeito nenhum, mas, ao se expor a luz desenvolveu fotossensibilidade no local por alguns meses (Machado, 2000; Simplício et al., 2002).

John Toth, gerente de produtos da *Cooper Medical Devices Corp/ Cooper Lasersonics*, confirmou o efeito químico da terapia com o uso de fotossensibilizadores e LASER de argônio, escrevendo, então, o primeiro artigo que renomeava a terapia como terapia fotodinâmica. Atualmente, a terapia fotodinâmica trata de vários tipos de

câncer e doenças infecciosas (Dougherty, Marcus, 1992; Lui, Anderson, 1992; Ackroyd et al., 2001).

2.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica representa uma alternativa efetiva de tratamento para infecções microbianas localizadas, como também em úlceras crônicas e infecções orais (Wainwright, Crossley, 2004). Na Odontologia, pesquisas estão sendo desenvolvidas para tratamento da doença periodontal devido à resistência microbiana, sendo um método benéfico e complementar as medidas convencionais (Malik et al., 2010). Em vários estudos comprovou-se que o uso frequente de antibióticos é uma das causas de resistência das bactérias (Walker, 1996; Manch-Citron et al., 2000; Feres et al., 2002). A terapia fotodinâmica emergiu como uma nova modalidade terapêutica não invasiva para o tratamento de várias infecções causadas por bactérias, fungos e vírus (Jori et al., 2006).

Ao combinar o uso de uma substância fotossensibilizadora e luz para tratamento antimicrobiano, a terapia fotodinâmica é denominada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT, do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*). Esta modalidade terapêutica apresenta um aspecto importante: repetidas aplicações sem resultado não selecionam as bactérias, assim, não desenvolvem resistência microbiana (Wainwright, Crossley, 2004).

Em comparação com outras terapias citotóxicas, a terapia fotodinâmica tem a possibilidade de agir no tecido infectado ou na célula-alvo e a fonte de luz pode incidir diretamente sobre o local da lesão (Demidiva, Hamblin, 2004).

As bactérias Gram-positivas são relativamente menos resistentes a terapia fotodinâmica em relação às Gram-negativas (Malik et

al., 1992). Isto ocorre devido a variações estruturais na parede celular. (Hancock, 1997; Vaara, 1992).

As bactérias Gram-negativas apresentam uma complexa membrana externa que inclui bicamadas lipídicas que funcionam como uma barreira física e funcional entre a célula e o meio externo. As bactérias Gram-positivas têm uma membrana espessa que é relativamente permeável (Perussi, 2007; Nagata et al., 2012), sendo possível a difusão do fotossensibilizador para locais sensíveis (Konopka, Goslinski, 2007; Nagata et al., 2012).

Diferenças na suscetibilidade à terapia fotodinâmica entre espécies que apresentam mesma classificação Gram são mais difíceis de explicar. Fatores importantes incluem algumas barreiras, como a permeabilidade da membrana, as diferentes enzimas antioxidantes ou os mecanismos de reparação de DNA, além de fatores simples, tais como o tamanho da célula (Demidova, Hamblin, 2004).

Schäfer et al. (2000) estudaram os diferentes métodos de desinfecção dos efluentes da água, através da inativação dos microorganismos *Escherichia coli*, *Deinococcus radiodurans* e esporos de *Bacillus subtilis* utilizando a combinação do fotossensibilizador rosa bengala, na concentração de 2 μM , com simulação de luz visível, obtida com uma lâmpada de xênon (Polytec, Waldbronn, Germany) de 90 J/cm^2 . Observou-se que os esporos não foram fotoinativados pelo rosa bengala.

Fekrazad et al. (2011) estudaram o efeito da terapia fotodinâmica em *Streptococcus mutans*, utilizando Radachlorin® (Radafarma Ltd, Rússia) gel 0,1% como fotossensibilizador e LASER de He-Ne (Plasma, Rússia) de 633 nm, densidade de energia 6 J/cm^2 . Observou-se que a combinação do Radachlorin® com o LASER foi mais eficaz que o uso do Radachlorin® ou do LASER ($p < 0,05$) isoladamente.

Junqueira et al. (2010) investigaram, *in vitro*, os efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica associada ao fotossensibilizador verde malaquita em culturas planctônicas de *Staphylococcus*,

Enterobacteriaceae e *Candida*, utilizando laser (660nm), observou que os micro-organismos foram sensíveis ao tratamento com verde malaquita, apresentando reduções de cerca de 7 Log₁₀ para *Staphylococcus*, 6 Log₁₀ para *Enterobacteriaceae*, e 0,5 Log₁₀ para o gênero *Candida*.

2.2.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é baseada no conceito que um determinado composto fotoativador ou fotossensibilizador pode ser preferencialmente localizado em certos tecidos e, subsequentemente, ativado pela luz de comprimento de onda apropriado para gerar oxigênio singlete e radicais livres que são citotóxicos para as células do tecido alvo (Soukos et al., 1998). Estudos têm demonstrado que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis a fotoinativação (Soukos et al., 1998; Bertoloni et al., 1992; Malik et al., 1990) em relação as bactérias Gram-negativas (Nitzan et al., 1995; Soukos et al., 1998).

A terapia fotodinâmica envolve dois estágios. O primeiro estágio consiste na aplicação de um agente fotossensibilizante. O segundo estágio envolve a aplicação de luz diretamente sobre a área tratada. Quando a luz é combinada com o agente, reações fototóxicas são induzidas para destruir células bacterianas (Malik et al., 2010).

No processo fotodinâmico a absorção de fótons (por unidade de volume de tecido) pelo fotossensibilizador só ocorre quando o comprimento de onda de luz irradiada pertence ao espectro de absorção da substância fotossensível (Salva, 2002; Emilio, 2008; Setúbal, 2007). Após a absorção da luz, o fotossensibilizador passa do estado fundamental para o estado singlete excitado de meia-vida curta (Salva, 2002; Ochsner, 1997a; Hendersn, Dougherty, 1992; Emilio, 2008; Setúbal, 2007; Malik et al., 2010). O composto singlete excitado pode retornar ao

estado fundamental emitindo luz na forma de fluorescência ou passar a um estado triplete excitado de meia-vida longa, por meio de um processo denominado de cruzamento entre sistemas. (Salva, 2002; Ochsner, 1997a; Hendersn, Dougherty, 1992; Emilio, 2008). No estado triplete excitado, o fotossensibilizador pode sofrer dois tipos de reação: tipo I e tipo II. Na reação tipo I, ocorre a transferência de um próton ou um elétron entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e o substrato ou moléculas do solvente, gerando íons-radicais, ânion ou cátion, que reagem com o oxigênio no estado fundamental, formando espécies reativas de oxigênio. Na reação tipo II, ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete diretamente ao oxigênio molecular, com a obtenção de oxigênio singlete altamente citotóxico (Oschner, 1997a; Machado, 2000; Setúbal, 2007; Castano et al., 2004; Henderson, Dougherty, 1992; Emilio, 2008). As reações podem ocorrer simultaneamente e dependem do tipo de fotossensibilizador utilizado, da concentração do substrato e de oxigênio (Castano et al., 2004; Emilio, 2008).

2.3 Oxigênio singlete

O oxigênio singlete corresponde aos três estados eletronicamente excitados e superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental, 3Σ (Machado, 2000). Assim, a molécula de oxigênio em seu estado fundamental é importante para os processos fotoquímicos devido ao elevado potencial químico e características únicas de reatividade (Turro, 1991). Segundo a Teoria Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados π_x e π_y . Esses elétrons tendem a possuir o mesmo *spin* produzindo multiplicidade

máxima e um estado de energia baixa. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio é um tripleto (Machado, 2000). O tempo de vida do oxigênio singleto em solução é profundamente influenciado pela natureza do solvente: em água, por exemplo, é de cerca de 4,0 μ s (Machado, 2000; Ochsner, 1997a; Dougherty et al., 1998). Em sistemas biológicos, o oxigênio singleto apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μ s. Em função disto, seu raio de ação é extremamente reduzido, <0,02 μ m (Machado, 2000; Malik et al., 2010).

2.4 Fotossensibilizador

Preparações iniciais de fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica basearam-se em uma mistura complexa de porfirinas, denominados de derivado da hematoporfirina. Extensas pesquisas química e biológica foram realizadas nos últimos 20 anos para identificar novos fotossensibilizadores que pertencem a diferentes classes de compostos (Brown et al., 2004; Tardivo et al., 2005).

O uso de corantes como agentes fotossensibilizadores vem sendo discutido desde o início do século. O fotossensibilizador ideal não deve ser tóxico por si só exercendo toxicidade somente após ativação por irradiação, não causar reação alérgica e nem hipotensão, ser hidrossolúvel, apresentar rápida excreção e ser biologicamente estável e fotoquimicamente eficaz e seletivo (Meisel, Kocher, 2005). Mais de 400 compostos são conhecidos com propriedades fotossensibilizantes incluindo corantes, medicamentos, cosméticos, produtos químicos e muitas substâncias naturais (Malik et al., 2010).

2.4.1 Azul de Metileno

O fotossensibilizador azul de metileno (AM) é o principal componente de um grupo de compostos derivados, os fenotiazínicos, que apresentam grande propensão a formação de espécies reativas de oxigênio – EROS (Marinho, 2006; Wainwright, Crossley, 2004). O AM é formado por um esqueleto tricíclico simples e, devido ao seu tamanho linear, torna-se ideal para intercalação com ácidos nucleicos. Apresenta absorção máxima na região do vermelho visível, com comprimento de onda de, aproximadamente, 660nm e hidrofílico em solução (Wainwright, 1998; Marinho, 2006).

O corante comercial fenotiazínico azul de metileno é um agente fotossensibilizador eficaz para a inativação de vírus, bactérias e leveduras (Wainwright, 1997). É também utilizado para inativação de uma variedade de vírus congelado em plasma fresco (Mohr et al., 1997; Wagner et al., 1994). Suas propriedades têm sido aplicadas na danificação, primariamente, do DNA da célula bacteriana e, em menor grau, a membrana exterior (Tuite, Kelly, 1993; Usacheva et al., 2001). O mecanismo de genotoxicidade do azul de metileno para destruir bactéria pode ser explicado com base na capacidade do fotossensibilizador em fotodegradar o DNA isolado *in vitro* em comparação com outros fenotiazínicos (Usacheva et al., 2001)

2.4.2 Rosa Bengala

O rosa bengala (RB) é um composto cíclico, pertencente ao grupo xanteno (Konopka, Goslinski, 2007) com três anéis aromáticos em arranjo linear e com um átomo de oxigênio no centro do anel, que

absorve a luz na região visível. Uma característica deste corante está no fato de não se ligar à membrana celular e localizar-se no citoplasma. O corante rosa bengala é um haleto derivado da fluoresceína e tem sido usado em oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias doenças externas do globo ocular. Como fotossensibilizador, pode matar micro-organismos, tais como vírus, bactérias e protozoários (Perussi, 2007). Apresenta forte absorção de luz num espectro de variação entre 500 a 550 nm correspondente ao diodo emissor de luz verde (Konopka, Goslinski, 2007).

2.4.3 Verde Malaquita

O fotossensibilizador verde malaquita (VM) é um corante catiônico pertencente à família triarilmetano, na qual também se inclui o cristal violeta. O VM apresenta forte absorção na região vermelha do espectro visível (Yamaoka, Sasai, 2000) e atravessa a parede celular de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Kowaltowski et al., 1999).

Verde malaquita é um biocida usado extensivamente na indústria da aquicultura no mundo. É altamente eficaz contra infecções causadas por protozoários e fungos (Alderman, 1985; Schnick, 1988), sendo também utilizado como ectoparasiticida, agente colorífico de alimentos, desinfetante e corante para seda, lã, couro, algodão, papel e produtos acrílicos (Culp, Beland, 1996; Srivastava et al., 2004).

2.5 Irradiação

2.5.1 LASER

O LASER, do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, foi descoberto em 1960. Em 1917, Albert Einstein formulou a Teoria da Emissão Estimulada cujo princípio baseia-se no fato de que, em condições adequadas, o átomo pode ser excitado a partir do bombardeamento de um meio ativo, elevando a um nível superior de energia. A emissão espontânea de energia ocorre quando o átomo retorna de seu estado excitado para um nível inferior e, então, o excesso de energia é liberado na forma de um par de fótons coerentes que segue em uma mesma direção (Marinho, 2006). Em 1960, a teoria se concretizou quando Theodore Harold Maiman construiu o primeiro emissor de LASER de rubi, fabricado com uma barra de rubi sintético (Midda, Renton-Harper, 1991; Marinho, 2006).

A invenção do LASER tornou possível a obtenção da luz com grande potência e em comprimentos de onda bem definidos (monocromaticidade). Isto facilitou sua aplicação em vários campos do conhecimento e a determinação dos efeitos biológicos da radiação em regiões muito específicas de comprimentos de onda (ou energia ou frequência) do espectro de radiação eletromagnético. No final da década de 60, início da década de 70, surgiram os primeiros LASER de materiais semicondutores, abrindo possibilidades ao emprego de LASER relativamente barato, de fácil manuseio e ao desenvolvimento de terapia com LASER de baixa potência, conhecido pela sigla LLLT, do inglês, *Low Level Laser Therapy* ou *Low Power Laser Therapy*. Os primeiros LASER semicondutores eram fabricados com GaAs (arseneto de gálio) ou ligas mais sofisticadas deste material, como AlGaAs (arseneto de gálio alumínio), geralmente com emissão na região do infravermelho (780 nm a

904 nm). Devido aos avanços nesta área, estruturas compostas por diferentes materiais semicondutores permitem a construção de LASER com emissão em todo espectro visível (Dias et al., 2009).

O uso crescente de amplificadores da luz por emissão estimulada de radiação LASER na Odontologia e na Medicina reflete o grande avanço desta tecnologia (Ishikawa et al., 2003). Vários estudos têm demonstrado que os processos de reparação, tais como inflamação dos tecidos moles e cicatrização óssea, e seus efeitos colaterais, como dor pós-operatória e hipersensibilidade dos dentes pós-tratamento, podem se tornar menos maléficos para o paciente quando da aplicação da terapia fotodinâmica (Yilmaz et al., 2002; Bjordal et al., 2006). Além disso, a associação do LASER de baixa potência com fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana também pode ser usada para reduzir a contaminação bacteriana de bolsas periodontais (Chan, Lai, 2003; O'Neill et al., 2002).

2.5.2 LED

O diodo emissor de luz (LED, do inglês, *Light Emitting Diode*) consiste num dispositivo com meio ativo semicondutor. Nos diodos emissores de luz, a luz é produzida por um processo chamado eletroluminescência. A luz emitida é monocromática e a cor varia conforme o cristal do meio interno (Carvalho et al., 2009). Os primeiros diodos emissores de luz comerciais foram desenvolvidos no começo da década de 60 e eram capazes apenas de produzir luz invisível infravermelha. Foram utilizados em sensores e nas aplicações fotoelétricas. A seguir, vieram os LED visíveis de cor vermelha. Na década de 70, os LED de cor verde e amarelo passaram a ser disponíveis, mas possuíam pouco brilho. Na década de 80, foi feita a

primeira linha de LED brilhante, inicialmente em vermelho, depois em amarelo e finalmente em verde. Os primeiros LED com emissão de luz azul apareceram na década de 90 (Martins, 2006).

O emprego do LED de baixa potência com finalidade terapêutica vem sendo ampliado ao longo dos últimos anos. Estudos desenvolvidos pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), nos Estados Unidos, demonstraram fortes evidências da eficiência do LED em processos de fotoestimulação celular, podendo ser comparado ao LASER de baixa potência (Vinck et al., 2003; Dias et al., 2009). Testes clínicos com aplicação de LED em cicatrização de úlceras em seres humanos já foram liberados, nos Estados Unidos, pela *Food and Drug Administration* - FDA (Whelan et al., 2001; Dias et al., 2009).

O emprego do LED pode propiciar um recurso terapêutico opcional aos convencionais ou ser utilizado em conjunto com estes, com a vantagem do baixo custo e comprovada eficiência no tratamento de úlceras e outras enfermidades (Dias et al., 2009).

2.6 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* inclui espécies validamente descritas e muitas outras espécies de taxonomia incerta. A grande heterogeneidade dentro do gênero é refletida na composição de bases do DNA de cepas de *Bacillus* e os resultados de, pelo menos, três grandes estudos taxonômicos numéricos confirmaram a necessidade de uma subdivisão do gênero. As espécies de *Bacillus* são aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram-positivas, suas células vegetativas são retas, redondas ou quadradas com hastes nas terminais que variam de 0,5 a 1,2 por 10 a 2,5 μm , ocorrendo isoladamente ou em cadeias. Os endosporos são cilíndricos, ovais, redondos, ou ocasionalmente em forma de rim;

dependendo da espécie, são localizados central, subterminal ou terminalmente. Com exceção do *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoides*, quase todas as espécies de *Bacillus* são móveis, embora haja grande tensão na variação do grau de mobilidade em qualquer espécie. A maioria é catalase positivo (Murray et al., 1995).

2.6.1 Esporos de *Bacillus* spp.

Os esporos de *Bacillus* spp. são formados na esporulação, processo de proteção que geralmente é induzido por níveis reduzidos de nutrientes e condições desfavoráveis a sobrevivência do micro-organismo no meio ambiente. Vários fatores podem ser responsáveis pela resistência dos esporos de *Bacillus* spp., calor, radiação, produtos químicos (Setlow, 2006) e alguns agentes antimicrobianos (Demidova, Hamblin, 2005).

A formação dos esporos bacterianos é um sofisticado mecanismo pelo qual algumas bactérias permanecem viáveis quando submetidas a condições inadequadas de sobrevivência, como estresse e falta de nutrientes, produzindo uma cápsula de várias camadas de proteção envolvendo o DNA condensado (Demidova, Hamblin, 2005). Desta maneira, as bactérias formadoras de esporos são mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos.

A formação dos esporos gera um tipo de célula que pode sobreviver por longos períodos com pouco ou nenhum nutriente, mas está apta a readquirir a forma vegetativa quando as condições ambientais tornarem-se adequadas a sua sobrevivência. Os esporos podem sobreviver por longos períodos sem nutrientes, ou seja, metabolicamente inativos, com pouco ou nenhum composto de alta energia sem apresentar

metabolismo de compostos endógenos ou exógenos e com pouca, ou nenhuma, atividade enzimática no core ou cerne (Setlow, 2006).

Os esporos podem sobreviver por muitos anos, certamente centenas, e há relatos sugerindo que os esporos podem sobreviver por milhares de anos. Como consequência, os esporos adquiriram uma infinidade de mecanismos para se protegerem. Estes mecanismos, que possivelmente evoluíram para a proteção dos esporos por períodos longos de inativação, também os protegem de danos causados por diferentes tratamentos. E essa resistência, assim como a onipresença de esporos no meio ambiente, faz com que estes microorganismos sejam os principais agentes de deterioração dos alimentos e doenças ocasionadas por estes alimentos contaminados (Setlow, 2006). Setlow et al. (2002) relatou que os esporos tratados com álcalis fortes parecem ser destruídos, porém quando são semeados em meio de cultura rico tornam-se viáveis reiniciando a germinação com lisozima exógena. Assim, após o tratamento para destruir os esporos é necessário semeá-los em meio de cultura rico para verificar a viabilidade destes organismos, pois em meio de cultura pobre podem não crescer.

Os esporos são relativamente resistentes a muitos dos agentes desinfetantes e anti-sépticos que rotineiramente destroem bactérias na forma vegetativa, tais como álcoois, fenóis e clorexidina (Sagripanti, Bonifacino, 1996; Demidova, Hamblin, 2005). Os agentes comumente citados como sendo anti-esporos são representados pelo calor superior a 121°C, pelo formaldeído ou glutaraldeído e soluções de hipoclorito de sódio (Russel, 2003; Whitney et al., 2003).

A estrutura e composição química dos esporos desempenham importante papel na resistência bacteriana. O esporo tem uma estrutura muito diferente de uma célula em crescimento, com uma série de características e componentes originais dos esporos. Analisando-se, morfológicamente, do exterior para o interior, as camadas do esporo incluem o exosporo, a camada de revestimento, a membrana externa, o

córtex, a parede das células germinativas, a membrana interna e o core ou cerne. O exosporo é uma grande estrutura solta encontrada em esporos de algumas espécies, em especial em *Bacillus cereus* (Driks, 2002; Lai et al., 2003; Redmond et al., 2004, Waller et al., 2004; Setlow, 2006). No entanto, esporos de várias espécies, incluindo *Bacillus subtilis*, ou não possuem um exosporo ou apresentam um tamanho reduzido. O exosporo, uma versão expandida da camada de revestimento, é composto de proteínas exclusivas, incluindo glicoproteínas (Lai et al., 2003, Todd et al., 2003; Daubenspeck et al., 2004; Redmond et al., 2004). Embora a função destas proteínas e do exosporo não estejam totalmente esclarecidas, dada a patogenicidade de muitas cepas, como o grupo *Bacillus cereus*, estas estruturas podem ser importantes na interação do esporo com organismo-alvo (Setlow, 2006).

A camada de revestimento do esporo é uma estrutura complexa, composta por várias camadas e com mais de 50 proteínas no *Bacillus subtilis*, a maioria das quais são produtos de genes específicos de esporos (Driks, 2002; Lai et al., 2003). A função de todas estas proteínas não é conhecida, embora algumas se encontram envolvidas na síntese da camada de revestimento e do exosporo (Bailey-Smith et al., 2005).

A função exata da membrana externa, localizada sobre as demais camadas, não é esclarecida, embora esta membrana seja uma estrutura essencial para a formação de esporos (Piggot, Hilbert, 2004). No entanto, a membrana externa não pode manter a integridade dos esporos inativos e, conseqüentemente, não representa uma barreira de permeabilidade significativa. Segundo Nicholson et al. (2000) e Setlow (2000), a remoção da membrana externa juntamente com as proteínas da camada de revestimento não tem nenhum efeito notável sobre a resistência de esporos em relação ao calor, a radiação e a alguns produtos químicos.

O córtex é composto por peptidoglicano (PG), com uma estrutura semelhante ao da forma vegetativa, mas com diversas modificações na especificidade (Popham, 2002). O córtex é essencial para a formação de esporos inativos e para a redução do teor de água do core destes. No entanto, o mecanismo pelo qual o córtex realiza esta função não é conhecido. Durante a germinação dos esporos, o córtex é degradado e este mecanismo é essencial para a expansão do core de esporos e crescimento subsequente (Setlow, 2003; Setlow, 2006).

A parede da célula germinativa é também composta de peptidoglicano e, provavelmente, não desempenha nenhum papel na resistência dos esporos, mas torna-se a parede celular do esporo em crescimento externo (Setlow, 2006). A membrana interna, em contraste com a membrana externa dos esporos, constitui uma barreira atribuindo forte permeabilidade e desempenhando um importante papel na resistência dos esporos a muitos produtos químicos, em especial aqueles que atravessam essa membrana causando danos ao DNA dos esporos (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2000; Cortezzo, Setlow, 2005; Setlow, 2006). A membrana interna é bem compacta nos esporos latentes, abrangendo volume duplicado nos primeiros minutos da germinação na ausência de produção de energia (Cowan et al., 2004; Setlow, 2006).

A camada final dos esporos é o core ou cerne, análogo ao protoplasma das células em crescimento e contém enzimas, bem como o DNA, ribossomos e RNAs. Em quase todos os casos, as enzimas do esporo e ácidos nucleicos são idênticas às células em crescimento (Setlow, 2006). Há também duas pequenas moléculas no core que são importantes na resistência dos esporos. A primeira é a água que compreende 75-80% do peso úmido do protoplasma de uma célula em crescimento, e nos esporos corresponde apenas a 27-55% do core ou cerne, dependendo da espécie. A quantidade de água livre no centro de esporos também é extremamente baixa, assim o movimento macromolecular é muito restrito. O baixo teor de umidade do core é

provavelmente o principal fator de inativação enzimática e o fator mais importante para determinar a resistência dos esporos ao calor úmido (Cortezzo, Setlow, 2005). No entanto, o mecanismo para a redução do teor de água no core dos esporos durante a esporulação não é conhecido (Setlow, 2003). A segunda molécula importante no core é o ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico). Esta molécula compreende 5-15% do peso seco dos esporos de *Bacillus* spp. (Setlow, 2006).

2.6.2 *Bacillus atrophaeus*

Bacillus atrophaeus (do latim *ater*, black; do grego *phaeus*, marrom) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, formadora de endosporos, móvel, em forma de haste. Produz catalase. Oxidase negativo. Apresenta descrição, praticamente, idêntica ao *Bacillus subtilis*, exceto pela produção de um pigmento marrom escuro quando cultivado em meios de cultura que contêm fonte de nitrogênio orgânico (Nakamura, 1989; Burke et al., 2004; Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Bacillus atrophaeus é comumente encontrado no solo em todo o mundo, sendo considerado não patogênico, amplamente utilizado em estudos como um substituto para *Bacillus anthracis* (Greenberg et al., 2010). Estudos realizados relataram que os esporos de *Bacillus atrophaeus* são pouco mais resistentes aos antimicrobianos quando comparados aos esporos de *Bacillus anthracis* (Weber et al., 2003). Esporos de *Bacillus atrophaeus* são utilizados como controle de esterilização (Russell et al., 1992; Pukall, 2001).

Diversas variantes pigmentadas de *Bacillus subtilis* foram reclassificadas como *Bacillus atrophaeus*, mas muitas ainda permanecem ambíguas em relação a taxonomia. Nakamura (1989) propôs pela primeira vez a espécie *Bacillus atrophaeus* depois de examinar uma série de

linhagens pigmentadas e não pigmentadas de *Bacillus subtilis* (Nakamura, 1989; Burke et al., 2004; Oliveira-Nascimento et al., 2012). Usando medições na reassociação do DNA-DNA, eletroforese enzimática e produção de pigmentos, ele demonstrou que um subgrupo das linhagens pigmentadas diferiu significativamente das outras linhagens pigmentadas e não pigmentadas tipificadas por *Bacillus subtilis*. Portanto, justificava-se a designação de nova espécie. As cepas pigmentadas restantes foram consideradas verdadeiras variantes de *Bacillus subtilis*. Os isolados incluídos no estudo Nakamura (1989) foram reclassificados em coleções de culturas e disponíveis publicamente. Recentemente, Fritze e Pukall (2001) examinaram duas cepas adicionais ATCC 9372 e ATCC 51.189 e, com base na ribotipagem e na reassociação de DNA-DNA, demonstraram a necessidade de reclassificá-las como *Bacillus atrophaeus*. Estas reclassificações resultaram em confusão dentro da comunidade de pesquisa de biodefesa (Burke et al., 2004).

Segundo Oliveira-Nascimento et al. (2012) a aplicação bem sucedida de esporos de *Bacillus subtilis* inativado como adjuvante na fabricação de vacina estimulou pesquisas para o uso dos esporos de *Bacillus atrophaeus* inativados como adjuvantes em vacinas contra raiva na Medicina Veterinária, devido a grande semelhança entre os organismos.

2.6.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria aeróbica, de forma cilíndrica, formadora de endosporo, móvel e possui flagelos (Dahl, 1999; Piggot, 2009). É responsável pela produção de vários produtos comercialmente importantes, como probióticos e vacinas (Piggot, 2009).

Bacillus subtilis foi identificado pela primeira vez em 1872 por Ferdinand Cohn que, também, demonstrou sua capacidade em formar esporos resistentes ao calor (Piggot, 2009). O nome *Bacillus subtilis* refere-se a uma característica importante: a subtilisina. A subtilisina E é uma protease serina alcalina extracelular codificada pelo gene *apr E* e se expressa, em associação com outros genes, no início do processo de esporulação (Dahl, 1999).

Bacillus subtilis é também encontrado no solo e em associação com plantas, não sendo patogênico ao homem e animais (Dahl, 1999; Piggot, 2009; Greenberg et al., 2010). *Bacillus subtilis* é utilizado com várias finalidades, sendo uma das mais importantes o controle de esterilização. Cepas desta espécie produzem esporos de resistência específica ao calor seco ou óxido de etileno e, portanto, é proposto para testar a eficácia de tais métodos para esterilização (Russell et al., 1992; Pukall, 2001).

Recentemente, esporos de *Bacillus subtilis* inativados foram apresentados como adjuvantes de micropartículas, sendo eficazes para a indução de títulos mais altos de IgG contra toxina do tétano em relação aos títulos induzidos somente pelo toxóide. Assim, os esporos vivos ou inativados são capazes de induzir boa resposta imune humoral e celular contra o antígeno testado (Huang et al., 2010; Oliveira-Nascimento et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica sobre esporos de *Bacillus atrophaeus* utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita, sob a ação do LASER de emissão vermelha, nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos;
- b) Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica sobre esporos de *Bacillus atrophaeus* utilizando o fotossensibilizador rosa bengala, sob a ação do diodo emissor de luz verde, nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos;
- c) Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica sobre esporos de *Bacillus subtilis* utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita, sob a ação do LASER de emissão vermelha, nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos;
- d) Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica sobre esporos de *Bacillus subtilis* utilizando o fotossensibilizador rosa bengala, sob a ação do diodo emissor de luz verde, nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparo da suspensão dos esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*

Foi utilizada cepa padrão de *Bacillus atrophaeus* (*American Type Culture Collection* – ATCC 9372) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659). A obtenção das suspensões esporuladas destes microorganismos foi baseada na metodologia de Penna et al. (2001) e Kuroiwa et al. (2003). Colônias de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* crescidas durante 7 dias em Ágar Nutriente (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) acrescidas de 0,003% de sulfato de manganês (Nuclear, Diadema, Brasil), foram analisadas quanto a formação de esporos por meio de coloração de Wirtz-Conklin. A partir da confirmação da esporulação, as colônias foram suspensas em água destilada esterilizada e centrifugadas por 10 minutos a 653 Xg (MPW 350, Biosystems, Curitiba, Brasil). Os sobrenadantes foram descartados e aos depósitos, adicionou-se 1 mL de água destilada esterilizada para nova centrifugação. Este procedimento foi repetido 3 vezes, e por fim, os sobrenadantes foram descartados e os depósitos ressuspensos em 3 mL de água destilada esterilizada. As suspensões receberam choque térmico de 70 °C por 30 minutos, e a presença de esporos foi novamente verificada pela coloração de Wirtz-Conklin. As suspensões foram padronizadas com 10^6 células/mL em espectrofotômetro (B 582, Micronal, São Paulo, Brasil) com densidade óptica de 0,178 e comprimento de onda 307 nm, com solução de NaCl 0,9% esterilizada.

4.2 Método de coloração de Wirtz-Conklin

O corante verde malaquita foi aquecido até emissão de vapor, sem ferver ou secar, e ficou em contato com o esfregaço por 5 minutos. Após a lâmina esfriar, lavou-se com filete de água corrente e o esfregaço foi corado, por um minuto, com safranina a temperatura ambiente. A seguir, lavado, secado e observado no microscópio óptico, na objetiva de imersão.

4.3 Terapia Fotodinâmica

Foram utilizados os fotossensibilizadores azul de metileno, AM, (Sigma, São Paulo, Brasil), rosa bengala, RB, (Sigma, São Paulo, Brasil) e verde malaquita, VM, (Synth, São Paulo, Brasil). As concentrações dos corantes utilizadas foram: 37,5 μM para AM; 12,5 μM para RB e 300 μM para VM, baseadas em artigos científicos com resultados promissores para estas concentrações testadas em microorganismos na forma vegetativa. A solução de cada fotossensibilizador foi preparada pela dissolução do pó de cada um em solução de NaCl a 0,9%. As soluções obtidas foram filtradas em membrana com poros de diâmetro de 0,22 μm (MFS, Dublin, EUA).

Para a fotossensibilização dos fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita foi utilizado como fonte de luz o LASER de Arseneto de Gálio Alumínio – vermelho visível - (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil). A fotossensibilização do rosa bengala foi realizada com diodo emissor de luz verde – LED (MMOptics, São Carlos, Brasil). Os parâmetros do LASER e do LED utilizados na terapia fotodinâmica em

esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros do LASER e do LED utilizados na Terapia Fotodinâmica em esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*

Parâmetros	LASER	LED
Comprimento de onda	660 nm	532 ± 10 nm
Potência	100 mW	90 mW
Energia	7,6 J	16,2 J
Área irradiada	0,38 cm ²	0,38 cm ²
Densidade de energia	20 J.cm ⁻²	42,635 J.cm ⁻²
Tempo de irradiação	76 s	180 s

4.4 Fotossensibilização in vitro

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano (Costar Corning, New York, EUA) com área de 0,38 cm², esterilizada e fechada, foi adicionado 0,1 mL de suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus* ou de *Bacillus subtilis* e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de solução de NaCl a 0,9%. A placa contendo as amostras permaneceu em período de pré-irradiação por 5, 10 e 30 minutos, movimentando-se em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) para maior penetração do fotossensibilizador nos micro-organismos estudados. As células não foram lavadas após o período de pré-irradiação.

Foram realizados 10 ensaios para cada grupo experimental nos 2 tempos de irradiação e nos 3 tempos de pré-irradiação acima citados com o uso do LASER e do LED, totalizando 560 ensaios laboratoriais.

A irradiação das amostras foi realizada sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar e isenta de qualquer fonte luminosa, utilizando-se um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço para evitar dispersão do feixe de luz.

Após a irradiação, diluições seriadas foram obtidas a partir de cada amostra. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas, com auxílio da Alça Drigalski, em placa com Ágar Infusão Cérebro-Coração (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, as Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) foram contadas e transformadas em logaritmo. Os resultados foram analisados, estatisticamente, pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados da terapia fotodinâmica em esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*, com os fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita sob a ação do LASER e o fotossensibilizador rosa bengala irradiado pelo LED, serão apresentados a seguir.

Conforme ilustrado nos resultados descritos abaixo, a ação da terapia fotodinâmica com seus respectivos fotossensibilizadores e fontes de luz apresentou redução de UFC/mL (Log_{10}) em relação ao grupo controle, de acordo com tipo de fonte de luz, fotossensibilizador e período de pré-irradiação avaliados.

5.1 Esporos de *Bacillus atrophaeus*: Azul de Metileno e LASER

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e fotossensibilização com azul de metileno nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus atrophaeus*.

5.1.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Não foi observada redução nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, conforme Figura 1 abaixo.

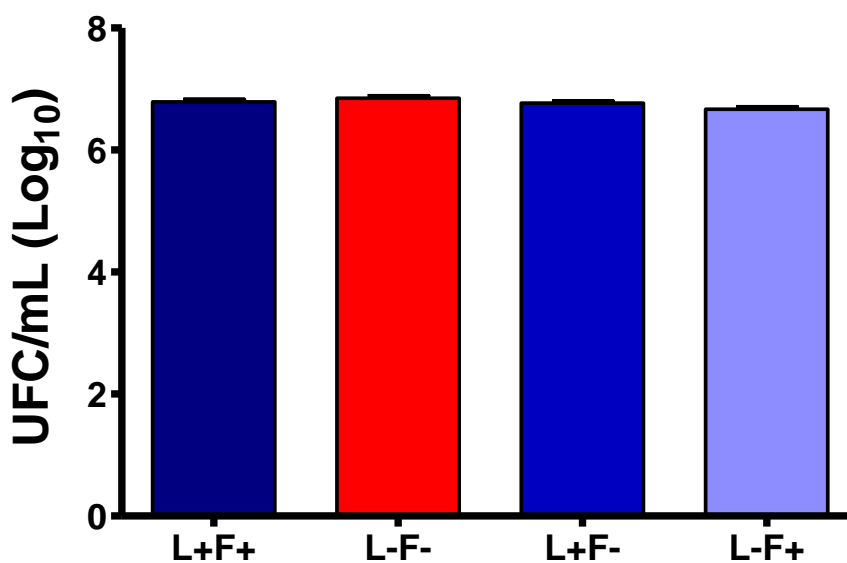


Figura 1 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min); L+F-, LASER.

5.1.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 0,71 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,003$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 2 abaixo.

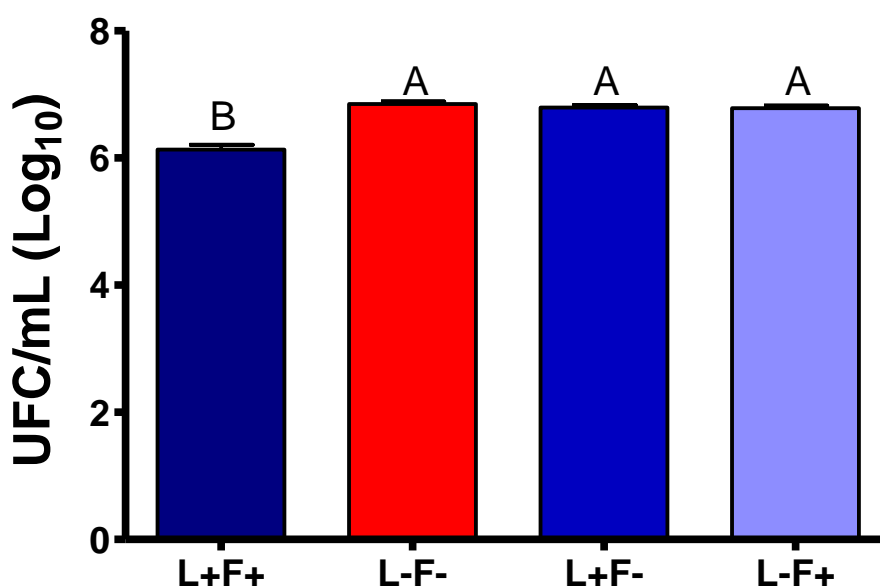


Figura 2 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.1.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Observou-se redução de 0,29 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,001$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 3 abaixo.

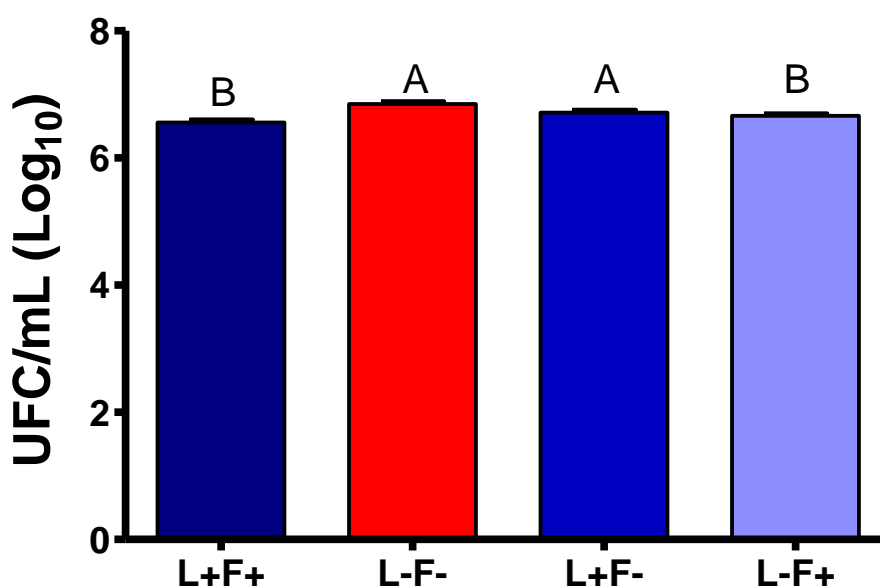


Figura 3 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.2 Esporos de *Bacillus atrophaeus*: Rosa Bengala e LED

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LED de luz verde e fotossensibilização com rosa bengala nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus atrophaeus*.

5.2.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Observou-se redução de 0,59 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,001$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 4 abaixo.

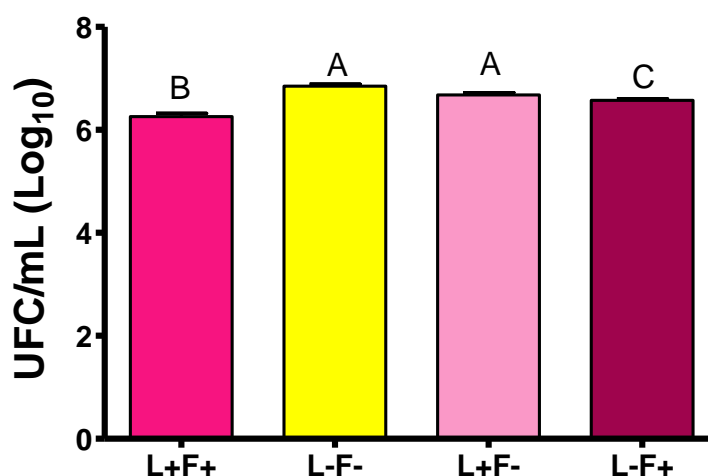


Figura 4 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.2.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 0,70 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,001$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 5 abaixo.

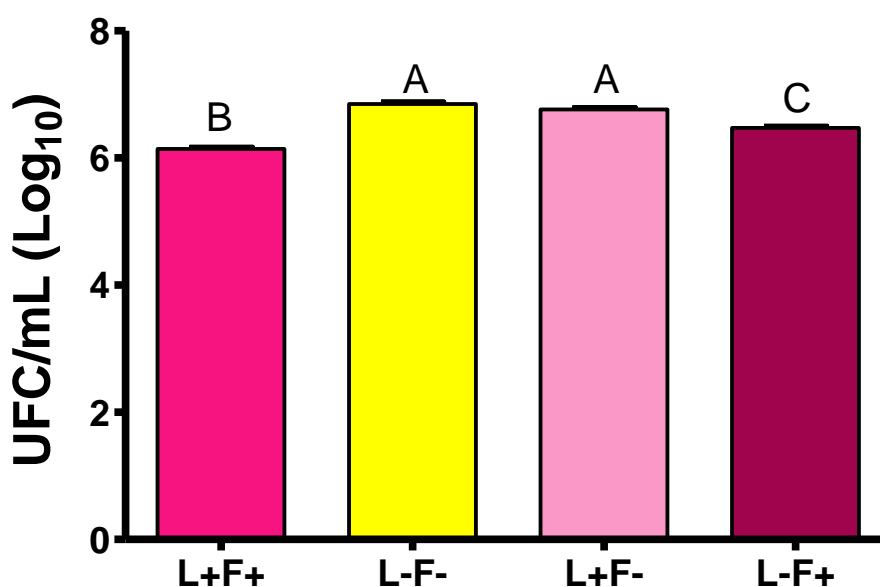


Figura 5 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.2.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Observou-se redução de 2,49 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,0002$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 6 abaixo.

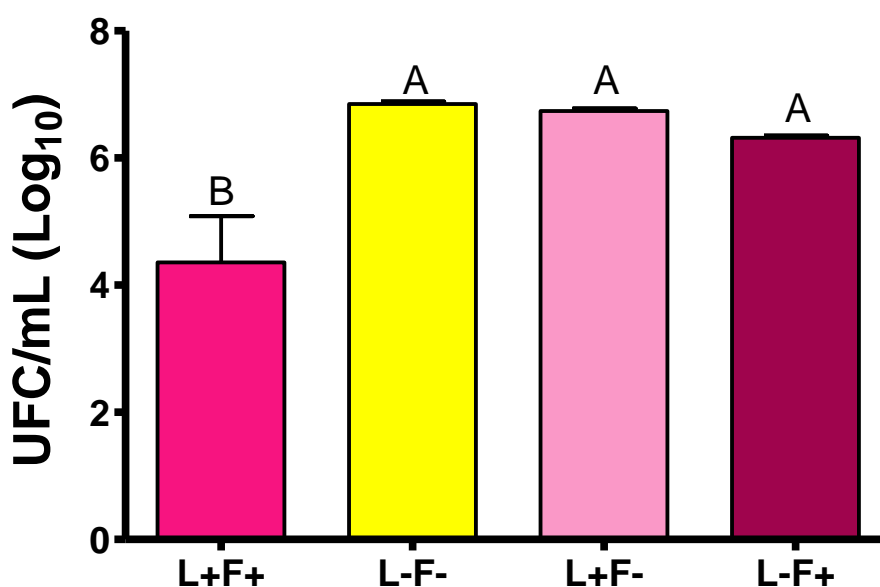


Figura 6 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.3 Esporos de *Bacillus atrophaeus*: Verde Malaquita e LASER

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e fotossensibilização com verde malaquita nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus atrophaeus*.

5.3.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Observou-se redução de 0,12 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, sem diferença estatisticamente significativa, conforme Figura 7 abaixo.

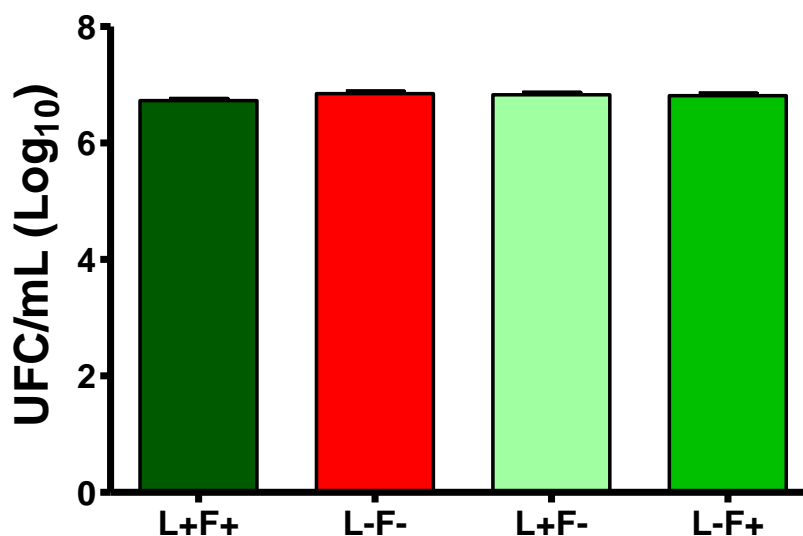


Figura 7 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min); L+F-, LASER.

5.3.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 0,42 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, apresentando diferença estatisticamente significativa, com valor de $p=0,002$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme figura 8 abaixo.

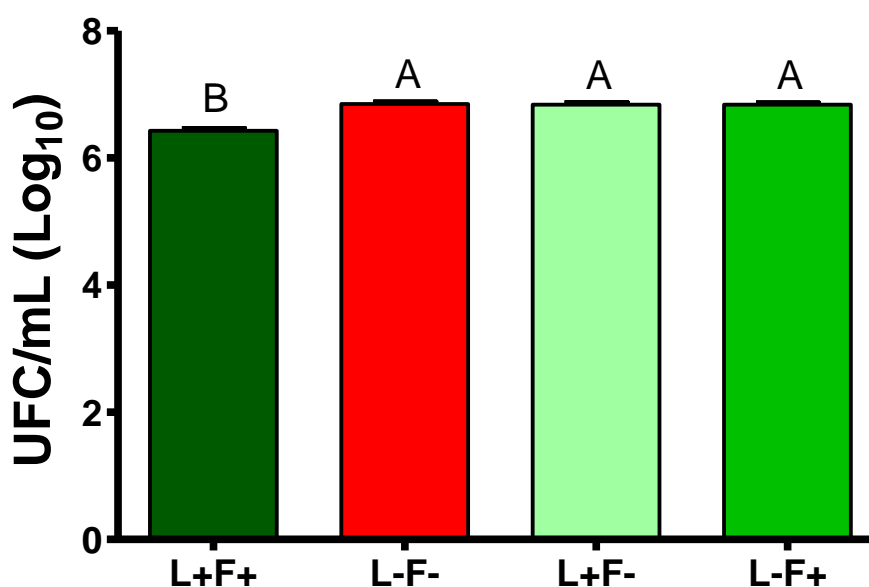


Figura 8 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.3.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Não foi observada redução nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, conforme Figura 9 abaixo.

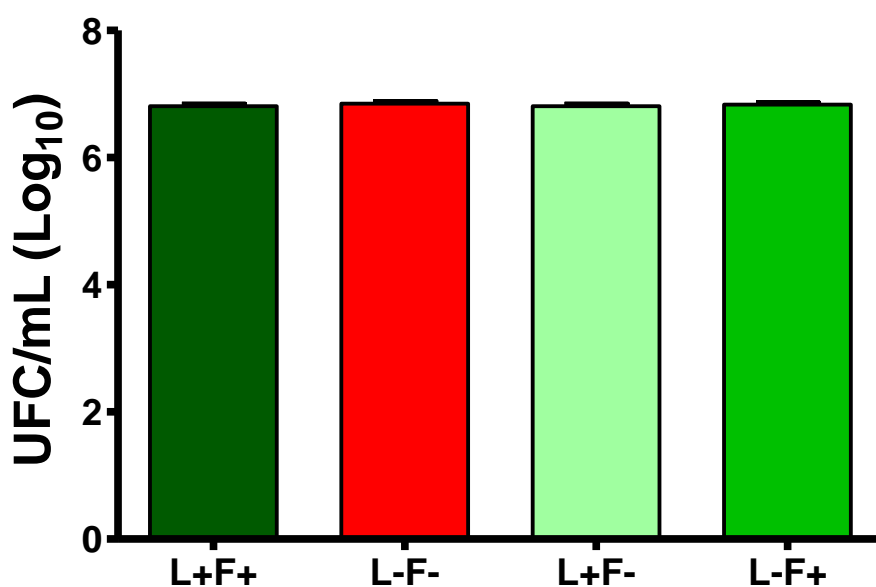


Figura 9 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min); L+F-, LASER.

5.4 Esporos de *Bacillus atrophaeus*: Comparativo geral

A figura 10 abaixo ilustra o comparativo geral dos ensaios laboratoriais realizados que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e LED de luz verde, fotossensibilização com azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus atrophaeus*.

Observou-se que a combinação LED e rosa bengala no tempo de pré-irradiação de 30 minutos apresentou a maior redução percentual (93,67%) em UFC/mL nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+.

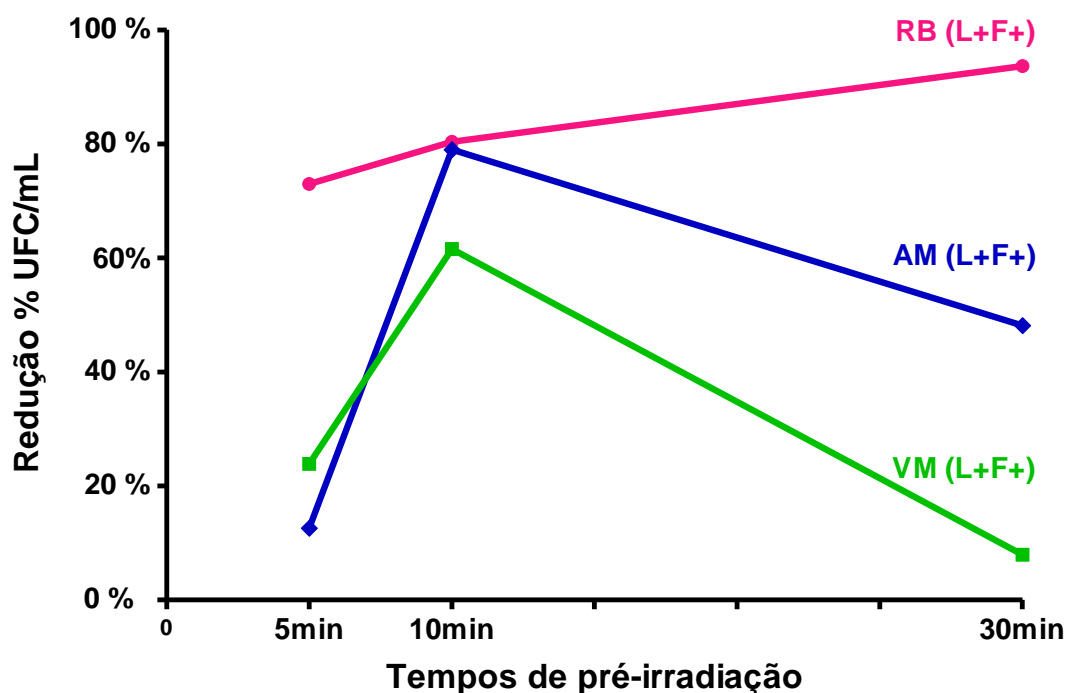


Figura 10 - Comparativo geral entre as reduções percentuais em UFC/mL nos diversos ensaios laboratoriais realizados em esporos de *Bacillus atrophaeus*.

5.5 Esporos de *Bacillus subtilis*: Azul de Metileno e LASER

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e fotossensibilização com azul de metileno nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus subtilis*.

5.5.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Não foi observada redução nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, conforme Figura 11 abaixo.

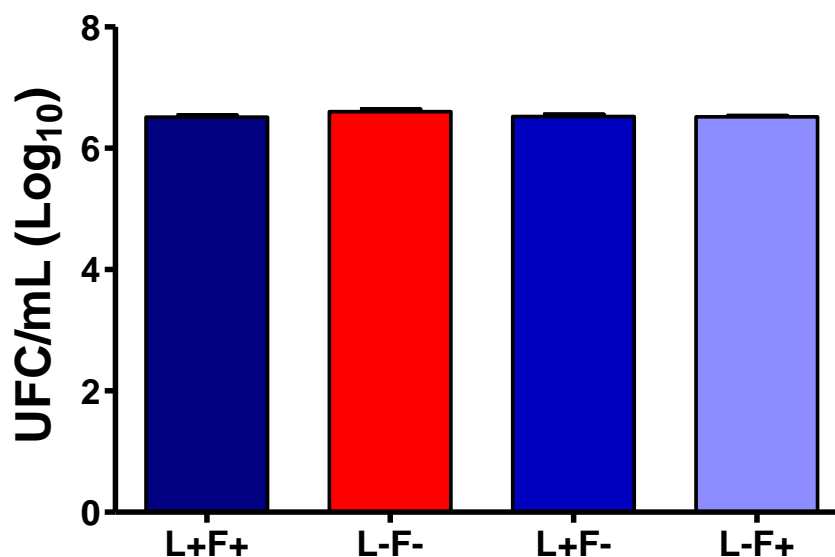


Figura 11 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min); L+F-, LASER.

5.5.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 0,82 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,01$, em relação ao grupo controle (L-F-) conforme Figura 12 abaixo.

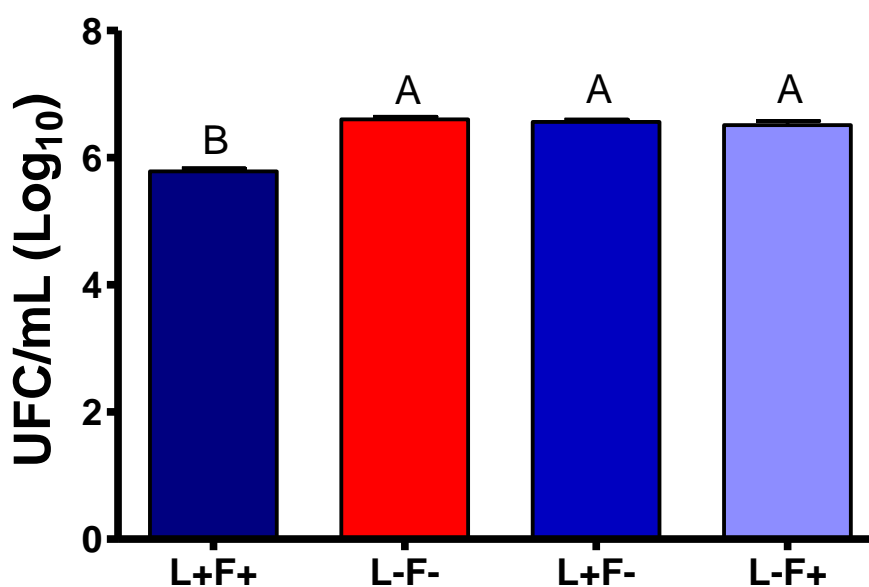


Figura 12 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.5.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Observou-se redução de 0,30 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,0002$, em relação ao grupo controle (L-F-) conforme Figura 13 abaixo.

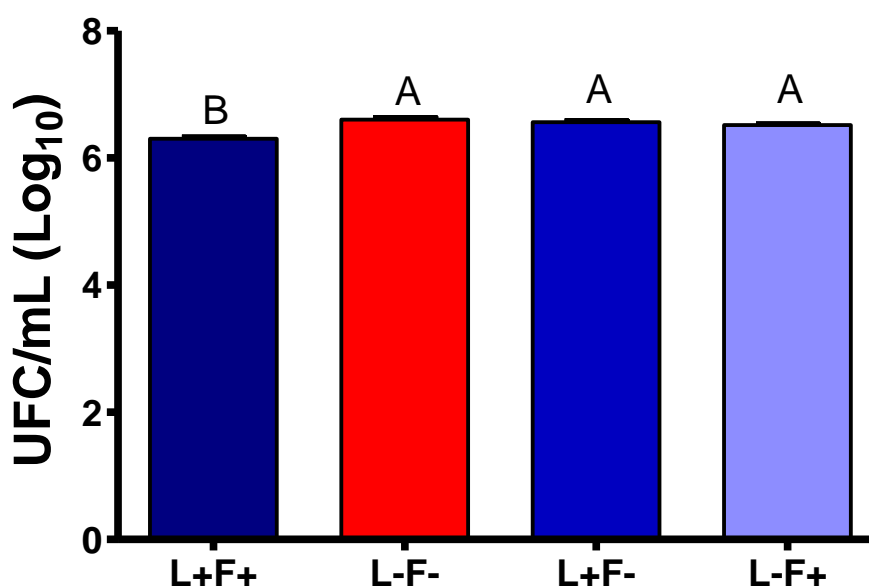


Figura 13 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.6 Esporos de *Bacillus subtilis*: Rosa Bengala e LED

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LED de luz verde e fotossensibilização com rosa bengala nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus subtilis*.

5.6.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Observou-se redução de 1,11 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,0001$, em relação ao grupo controle (L-F-) conforme Figura 14 abaixo.

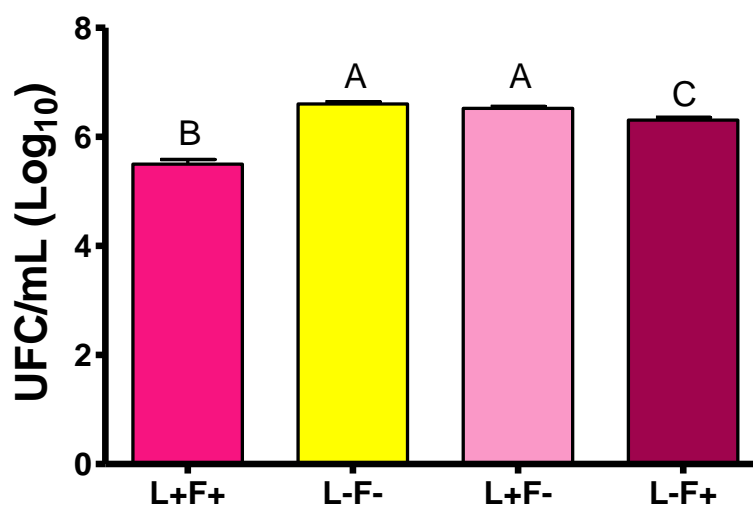


Figura 14 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.6.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 1,27 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,0002$, em relação ao grupo controle (L-F-) conforme Figura 15 abaixo.

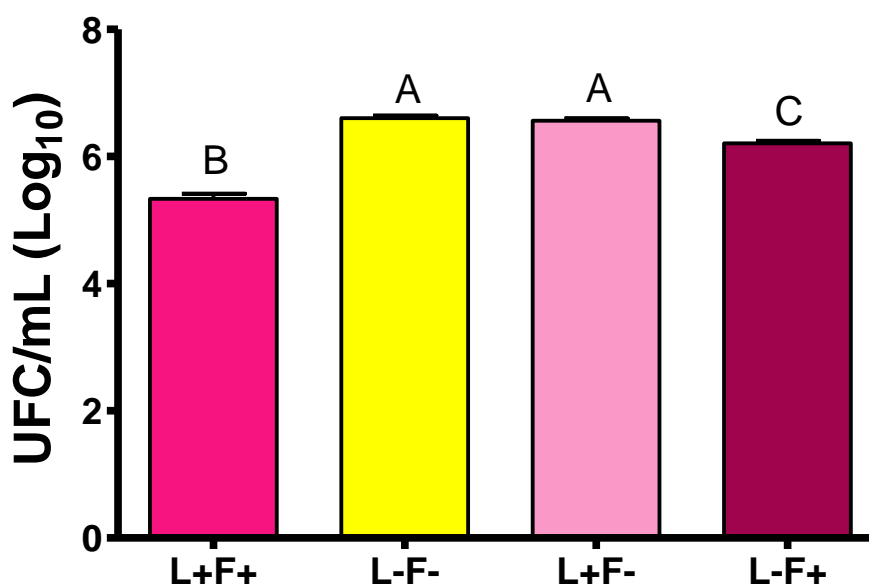


Figura 15 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.6.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Observou-se redução de 3,86 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme Figura 16 abaixo.

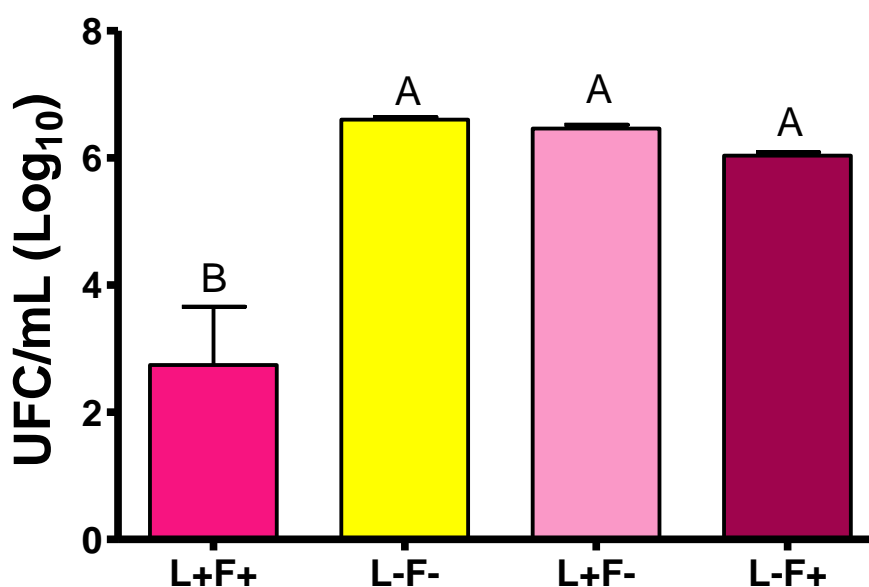


Figura 16 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min); L+F-, LED. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.7 Esporos de *Bacillus subtilis*: Verde Malaquita e LASER

Foram realizados ensaios laboratoriais que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e fotossensibilização com verde malaquita nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus subtilis*.

5.7.1 Tempo de pré-irradiação de 5 minutos

Observou-se redução de 0,23 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,008$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme Figura 17 abaixo.

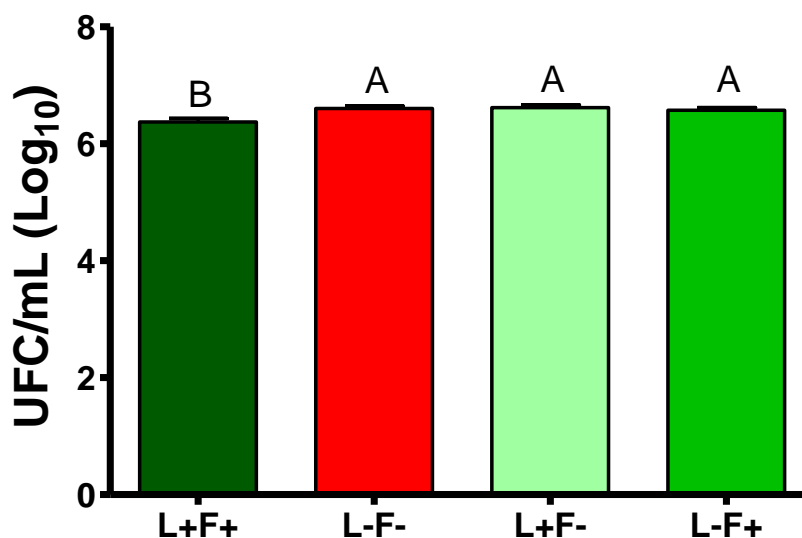


Figura 17 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.7.2 Tempo de pré-irradiação de 10 minutos

Observou-se redução de 0,63 UFC/mL (Log_{10}) nas médias obtidas, com diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos (L-F-, L+F- e L-F+) e o grupo submetido a PDT (L+F+), com valor de $p=0,002$, em relação ao grupo controle (L-F-), conforme Figura 18 abaixo.

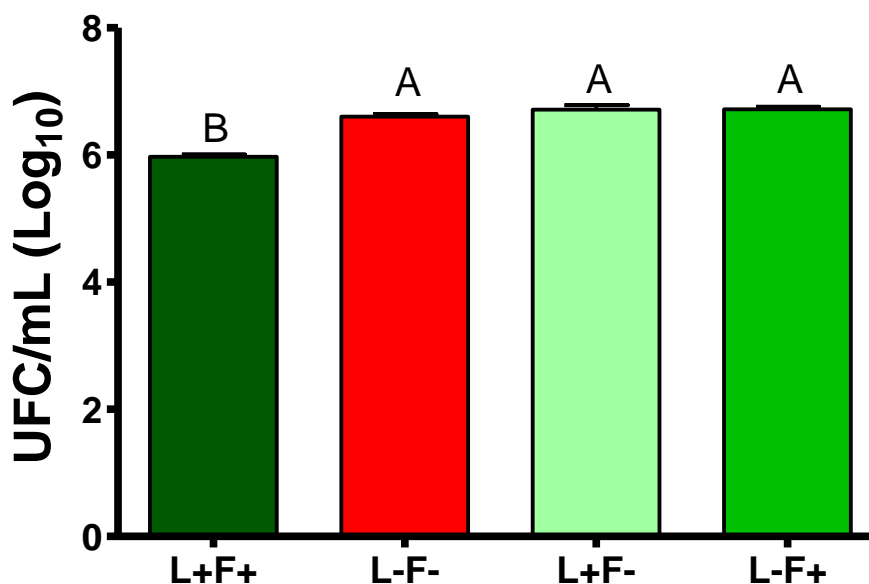


Figura 18 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min); L+F-, LASER. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais.

5.7.3 Tempo de pré-irradiação de 30 minutos

Não foi observada redução nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+, conforme Figura 19 abaixo.

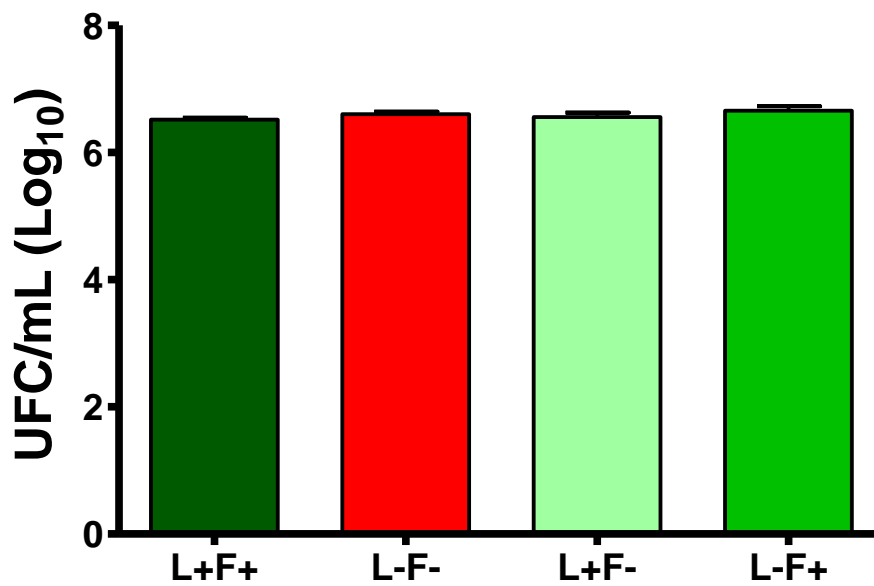


Figura 19 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min); L+F-, LASER.

5.8 Esporos de *Bacillus subtilis*: Comparativo geral

A figura 20 abaixo ilustra o comparativo geral dos ensaios laboratoriais realizados que consistiram na irradiação com LASER de emissão vermelha e LED de luz verde, fotossensibilização com azul de metileno, rosa bengala e verde malaquita nos tempos de pré-irradiação de 5, 10 e 30 minutos em esporos de *Bacillus subtilis*.

Observou-se que a combinação LED e rosa bengala no tempo de pré-irradiação de 30 minutos apresentou a maior redução percentual (96,15%) em UFC/mL nas médias obtidas no grupo submetido a PDT (L+F+), em relação aos grupos L-F-, L+F- e L-F+.

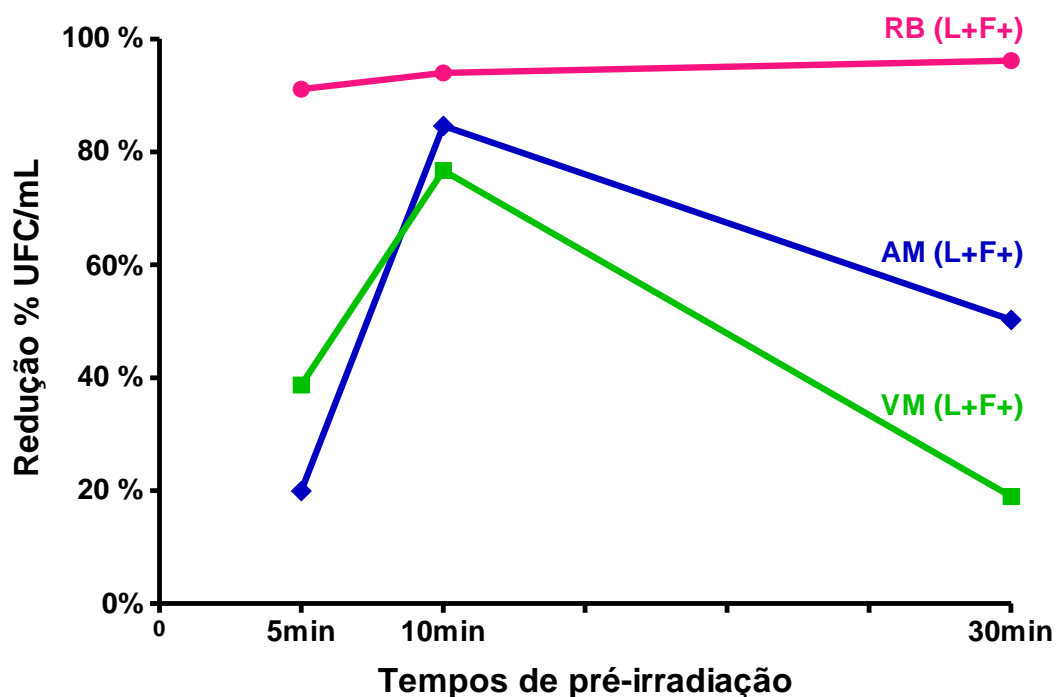


Figura 20 - Comparativo geral entre as reduções percentuais em UFC/mL nos diversos ensaios laboratoriais realizados em esporos de *Bacillus subtilis*.

6 DISCUSSÃO

A formação de esporos é um sofisticado mecanismo pelo qual algumas bactérias sobrevivem em condições de estresse e escassez de nutrientes. Os esporos são altamente resistentes ao calor, à radiação e a vários agentes antibacterianos.

Cepas das espécies de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* são utilizadas com inúmeras finalidades, sendo uma das mais importantes no controle da esterilização (Russell et al., 1999; Pukall, 2001). Comumente encontrados no solo, os esporos bacterianos têm assumido crescente destaque na contaminação do meio ambiente (Oliveira et al., 2009; Hill et al., 1996; Skanavis, Yanko, 2001). *Bacillus subtilis* e *Bacillus atrophaeus* são considerados substitutos clássicos não patogênicos do *Bacillus anthracis*, sendo utilizados em diversos estudos (Greenberg et al., 2010; Stratis-Cullum et al., 2003; Turnbough, 2003; Burke et al., 2004).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador rosa bengala (12,5 μM) no tempo de pré-irradiação de 30 minutos, tendo como fonte de luz o diodo emissor de luz verde, irradiado por 3 minutos, apresentou a maior redução com diferença estatisticamente significativa em esporos de *Bacillus atrophaeus* (2,49 Log_{10}) e *Bacillus subtilis* (3,86 Log_{10}), quando comparados ao grupo controle. O tempo de exposição do fotossensibilizador na pré-irradiação pode contribuir para que este adquira diferentes localizações na célula. Ito (1983) e Usacheva et al. (2001) demonstraram que o mecanismo de inativação de uma célula depende, principalmente, do tempo de pré-irradiação que o fotossensibilizador é submetido. A diferença na eficácia do fotossensibilizador devido ao tempo

de exposição no período de pré-irradiação pode indicar a presença de barreiras de difusão celular que impedem o fotossensibilizador de alcançar uma ótima localização no interior da célula bacteriana (Wagner et al., 1998; Usacheva et al., 2001).

Tal afirmação é comprovada no presente estudo, quando a terapia fotodinâmica é realizada com o LED e o rosa bengala, tanto para esporos de *Bacillus atrophaeus* quanto para os esporos de *Bacillus subtilis*, pois conforme ilustrado nas figuras 4, 5, 6, 14, 15 e 16, existe dependência entre o tempo de pré-irradiação e a taxa de redução das unidades formadoras de colônias dos micro-organismos apresentada. Assim, é possível afirmar que para o conjunto fonte de luz e fotossensibilizador, o aumento dos tempos de pré-irradiação produz aumento na taxa de redução microbiana nos grupos submetidos à terapia fotodinâmica, com diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle.

Porém, estudos realizados por Schäfer et al. (2000) diferem dos resultados apresentados neste estudo, pois relataram que os esporos de *Bacillus subtilis* não foram suscetíveis a fotoativação pelo fotossensibilizador rosa bengala, na concentração de 2 μM , com simulação de luz visível, obtida com uma lâmpada de xênon (Polytec, Waldbronn, Germany) de 90 J/cm^2 . Deste modo, a eficácia dos resultados obtidos neste trabalho pode ser explicada pela maior concentração do fotossensibilizador rosa bengala e pelo tipo de fonte de luz utilizados em comparação com os estudos de Schäfer et al. (2000).

A formação de espécies reativas de oxigênio na terapia fotodinâmica depende da interação de fótons da luz visível, em comprimento de onda adequado, com o fotossensibilizador. Esta interação só ocorre quando a fonte de luz emitir luz no comprimento de onda que o fotossensibilizador é capaz de absorver (Donnelly et al., 2008). Assim, no presente estudo, a utilização do LED com emissão de luz em $532 \pm 10 \text{ nm}$ foi adequada para a reação fotodinâmica, pois na

análise do espectro de absorção do fotossensibilizador rosa bengala, este apresenta forte absorção de luz num espectro de variação entre 500 a 550 nm (Konopka, Goslinski, 2007).

Em relação ao efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno (37,5 μM) tendo como fonte de luz o LASER de emissão vermelha, irradiado por 76 segundos, os resultados obtidos neste estudo apresentaram redução, com diferença estatisticamente significativa, em esporos de *Bacillus atrophaeus*, nos tempos de pré-irradiação de 10 minutos (0,71 Log_{10}) e 30 minutos (0,29 Log_{10}); e, também, redução com diferença estatisticamente significativa em *Bacillus subtilis* nos tempos de pré-irradiação de 10 minutos (0,82 Log_{10}) e 30 minutos (0,30 Log_{10}), quando comparados ao grupo controle.

Estudos realizados sobre a eficácia antibacteriana do azul de metileno e do azul de toluidina têm demonstrado resultados divergentes na literatura. Usacheva et al. (2001) avaliou, *in vitro*, a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina como fotossensibilizadores letais de um número de diferentes micro-organismos patogênicos, em condições uniformes, a fim de demonstrar as peculiaridades do comportamento bactericida dos fotossensibilizadores em relação aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos demonstraram que todos os micro-organismos irradiados pelo LASER, na presença do azul de metileno ou do azul de toluidina, apresentaram redução. No entanto, a capacidade de inativar as células-alvo foi dependente do tipo de fotossensibilizador e sua concentração, da influência da intensidade da luz do laser e do gênero das bactérias. Concluiu-se que o aumento da concentração dos fotossensibilizadores, sob as mesmas condições de luminosidade resultou em maior redução dos micro-organismos. Assim, todas as bactérias Gram-positivas e *Hemophilus influenzae* foram destruídas numa variação na concentração de 4 a 28 μM para azul de

toluidina e de 25 a 44 μM para azul de metileno. Para produzir uma redução nas bactérias Gram-negativas foi necessário um aumento de 3 a 30 vezes em relação às concentrações dos fotossensibilizadores.

Comparando-se as concentrações utilizadas do fotossensibilizador azul de metileno nos estudos acima descritos com a concentração do presente estudo, pode-se esperar que um aumento nas concentrações associado a um tempo de exposição de 10 ou 30 minutos do fotossensibilizador na pré-irradiação atinja um ponto ótimo para que o fotossensibilizador penetre na célula hospedeira propiciando sua localização exata na célula afetada.

Demidova e Hamblin (2005) estudaram a ação da terapia fotodinâmica em esporos de *Bacillus* spp. mediada por fotossensibilizadores pertencentes ao grupo fenotiazínico e observaram que os esporos foram suscetíveis a fotoinativação, sendo mais eficaz quando o excesso de fotossensibilizador era retirado através da lavagem das células, pois como se liga aos esporos pode impedir a absorção da luz. Dentre os fotossensibilizadores fenotiazínicos testados, o azul de metileno, na concentração de 50 μM , sob ação de um feixe de fibras intercambiáveis de luz vermelha de 40 J/cm^2 , com tempo de incubação de 3 horas a 37°C, foi o menos eficaz. Ainda segundo os autores, tempos mais curtos de incubação e temperaturas mais baixas de incubação foram menos eficazes, sugerindo que a penetração do fotossensibilizador nos esporos ocorreu através de um processo de difusão passiva, significativamente dependente do tempo e temperatura mais elevados.

Ergaieg e Seux (2009) realizaram estudo comparando os efeitos da terapia fotodinâmica em bactérias Gram-positiva (*Enterococcus hirae*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*), utilizando os fotossensibilizadores meso-porfirina, rosa bengala e azul de metileno, nas concentrações de 0,73 e 3,65 μM , num período de pré-irradiação de 10 minutos, e fonte de luz visível (0,285W/cm²). Concluíram que o fotossensibilizador meso-porfirina (0,73 μM) foi mais eficiente que o rosa

bengala e o azul de metileno (3,65 μM) e que a lavagem das células para retirada do excesso de fotossensibilizador antes da irradiação não apresentou alteração significativa. Isto diverge com Demidova e Hamblin (2005) que afirmam que o efeito mais eficaz da fotoinativação é obtido pela lavagem do excesso de fotossensibilizador dos esporos para não impedir a absorção de luz.

Os autores Ergaieg e Seux (2009) sugerem a hipótese da existência de três tipos de fotossensibilizadores: os que estão estreitamente vinculados ao micro-organismo e, portanto, penetram nele; os que se ligam fracamente e os que não apresentam ligação.

Assim, para a obtenção dos efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica é necessário considerar a ação dos fotossensibilizadores fenotiazínicos, as concentrações destes, os tipos de micro-organismos, o tempo de incubação sem presença de luz e a exposição ao LASER de emissão vermelha sobre a destruição irreversível de diferentes micro-organismos patogênicos.

A inativação fotossensível de micro-organismos é um complexo fenômeno e depende de vários parâmetros. Portanto, o mecanismo total da morte celular vai depender de muitos fatores, incluindo a probabilidade de aderência do fotossensibilizador na membrana externa da célula, permeando através da membrana celular e tendo a capacidade de interagir com os diferentes substratos da célula, incluindo DNA. Deste modo, a localização do fotossensibilizador na célula pode ser o fator de determinação da eficácia destes no processo fotodinâmico (Canete et al., 1993).

O fotossensibilizador azul de metileno é um corante metacromático, portanto sofre alteração na coloração em determinadas circunstâncias, devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas que resultam na agregação de suas moléculas e mudança no espectro de absorção (Usacheva et al., 2003). A dificuldade que certas moléculas exógenas enfrentam em difundir-se pelas estruturas dos esporos deve-se

à natureza impermeável das camadas que, provavelmente, é responsável por grande parte da resistência que apresentam a produtos químicos (Setlow, 2000; Demidova, Hamblin, 2005).

O corante fenotiazínico azul de metileno é formado por pequenas moléculas que possuem uma carga catiônica molecular intrínseca que permite sua ligação às membranas geralmente aniônicas exteriores de células bacterianas e fúngicas (Phoenix et al., 2003; Wainwright et al., 1997; Demidova, Hamblin, 2005). Investigou-se a possibilidade de um fotossensibilizador de pequena carga catiônica ser eficaz contra os esporos. No entanto, não conseguiram demonstrar qualquer eficiência na terapia fotodinâmica em esporos utilizando porfirina tricatiônica (molécula pequena) utilizada para mediar a terapia fotodinâmica em diferentes células bacterianas (Lambrechts et al., 2004; Demidova, Hamblin, 2005) e fúngicas (Smijs, Schuitmaker, 2003; Demidova, Hamblin, 2005). Existe, portanto, outra característica molecular envolvida, além da carga catiônica e tamanho molecular. Isto pode estar relacionado com a capacidade de corantes fenotiazínicos formarem dímeros.

Os resultados obtidos neste estudo sobre o efeito fotodinâmico mediado pelo fotossensibilizador verde malaquita (300 μM) tendo como fonte de luz o LASER de emissão vermelha, irradiado por 76 segundos, demonstraram redução sem diferença estatisticamente significativa no tempo de pré-irradiação de 5 minutos (0,12 Log_{10}), redução com diferença estatisticamente significativa no tempo de 10 minutos (0,42 Log_{10}) em esporos de *Bacillus atrophaeus*, e também redução com diferença estatisticamente significativa em *Bacillus subtilis* nos tempos de pré-irradiação de 5 minutos (0,23 Log_{10}) e 10 minutos (0,63 Log_{10}), quando comparados ao grupo controle.

Estudo realizado por Vilela et al. (2011) comparou, *in vitro*, a ação do verde malaquita com os fotossensibilizadores fenotiazínicos azul de metileno e azul de toluidina, apresentando

variações nas concentrações de 37,5 a 3000 μM , sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, usando diodo de LASER (660-nm). Observou-se que os melhores resultados para os biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram obtidos com o fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 300 μM , com redução de 0,8 - 1,0 Log_{10} ; 150 μM de azul de toluidina, com reduções de 0,9-1,0 Log_{10} e o verde malaquita na concentração de 3000 μM , com reduções microbianas de 1,6-4,0 Log_{10} . Conclui-se, então, que a maior redução microbiana foi alcançada com o fotossensibilizador verde malaquita quando utilizado em concentrações mais elevadas do que as utilizadas para os fenotiazínicos.

Prates et al. (2007) avaliaram a capacidade do verde malaquita, combinado com LASER de emissão vermelha de baixa potência (660 nm), para inativar culturas planctônicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, irradiados por 5 minutos com densidade de energia de 9 J/cm^2 , obtendo redução microbiana de 2 a 3 Log_{10} .

Rolim et al. (2012) compararam, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica com diferentes fotossensibilizadores, nas mesmas concentrações, sobre *Streptococcus mutans*. Os fotossensibilizadores azul de metileno, orto azul de toluidina e verde malaquita, nas concentrações de 163,5 μM , foram irradiados por diodo emissor de luz (636 nm), enquanto eosina, eritrosina e rosa bengala foram submetidos a um fotopolimerizador (570 nm). Os fotossensibilizadores orto azul de toluidina e verde malaquita foram eficazes na redução de *Streptococcus mutans* de 3 e 1,4 Log , respectivamente ($p < 0,01$).

Brovko et al. (2009) avaliaram a aplicação da terapia fotodinâmica com verde malaquita, em concentrações de 15 a 15000 μM , nos métodos de higienização da indústria alimentícia, sob ação de luz branca. Utilizando-se culturas planctônicas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus* spp. e *Listeria monocytogenes*), Gram-negativas (*Escherichia*

coli e *Salmonella typhimurium*) e fungo (*Saccharomyces cerevisiae*) constataram que o verde malaquita eliminou as bactérias Gram-positivas, porém não foi igualmente eficaz contra as bactérias Gram-negativas ou o fungo, obtendo reduções de *Bacillus* spp. com verde malaquita a partir de 15000 μM .

Sugere-se a hipótese de uma fotodegração do fotossensibilizador verde malaquita desencadeada com o decorrer do tempo de exposição (a partir de 10 minutos) a que foi submetido, resultando na inativação de suas propriedades no processo da terapia fotodinâmica. Outra justificativa baseia-se no fato do fotossensibilizador verde malaquita ser o tipo de fotossensibilizador que não se liga à célula ou não penetra em quantidade suficiente, portanto, não difunde para o interior dos esporos e não causa fotodano ao micro-organismo. É possível que as diferenças de permeabilidade que as estruturas dos esporos apresentam sejam, principalmente, responsáveis pelas diferenças acentuadas na terapia fotodinâmica entre espécies de *Bacillus*. (Demidova, Hamblin, 2005). Confirmando, assim, a hipótese sugerida por Demidova e Hamblin (2005) que tempos de incubação mais curtos e temperaturas de incubação mais baixas são menos eficazes.

Apesar da ação fotodinâmica exercida pelos fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita associados ao LASER não apresentar grandes reduções em UFC/mL (Log_{10}), tais resultados não deixam de ser considerados importantes, visto que, neste estudo trabalhou-se com o micro-organismo na forma esporulada.

Os resultados obtidos neste estudo sobre o efeito fotodinâmico para os grupos L+F- e L-F+ que utilizaram isoladamente o LASER e os fotossensibilizadores azul de metileno e verde malaquita, respectivamente, não apresentaram reduções significativas em UFC/mL (Log_{10}) quando comparados ao grupo controle (L-F-). Os resultados estão de acordo com a afirmação que a terapia fotodinâmica envolve o uso de um corante não tóxico sensível a luz, chamado de fotossensibilizador,

combinado com uma fonte de luz visível de comprimento de onda apropriado para coincidir com o espectro de absorção do fotossensibilizador (Hunt, 2002; Dai et al., 2012).

Na análise dos resultados obtidos sobre o efeito fotodinâmico para os grupos L+F- e L-F+ que utilizaram isoladamente o LED e o fotossensibilizador rosa bengala, verificou-se que o LED isoladamente (L+F-) não produz nenhuma redução significativa em UFC/mL (Log_{10}) quando comparado ao grupo controle (L-F-). Entretanto para os grupos que utilizaram o fotossensibilizador rosa bengala isoladamente foram observadas reduções com diferença estatisticamente significativa nos períodos de exposição de 5 minutos (0,27 Log_{10}) e 10 minutos (0,37 Log_{10}), redução sem diferença estatisticamente significativa no período de exposição de 30 minutos (0,53 Log_{10}) em esporos de *Bacillus atrophaeus*. Apresentaram também redução com diferença estatisticamente significativa em *Bacillus subtilis* nos períodos de exposição de 5 minutos (0,30 Log_{10}) e 10 minutos (0,40 Log_{10}), redução sem diferença estatisticamente significativa no período de exposição de 30 minutos (0,57 Log_{10}) quando comparados ao grupo controle. Rolim et al. (2012) estudaram os efeitos de vários fotossensibilizadores, entre os quais o rosa bengala, em *Streptococcus mutans* e obtiveram completa redução do micro-organismo utilizando apenas o fotossensibilizador rosa bengala na concentração de 163,5 μM .

Comparando os resultados entre os esporos das duas espécies de *Bacillus* estudadas, os esporos de *Bacillus atrophaeus* foram mais resistentes ao método antimicrobiano utilizado.

As divergências encontradas nas respostas a resistência ou a suscetibilidade dos esporos de *Bacillus* spp. quando submetidos aos mesmos tratamentos está relacionada a diferenças nas estruturas dos esporos (Demidova, Hamblin, 2005)

Fenotipicamente, *Bacillus atrophaeus* é indistinguível de uma cepa de *Bacillus subtilis*, exceto pela produção de pigmentos quando

cultivados em meios de cultura ricos em nitrogênio orgânico (Burke et al., 2004; Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Segundo Genest et al. (2002), os esporos de *Bacillus subtilis* são suscetíveis aos agentes que produzem espécies reativas de oxigênio .

Bacillus atropheus tem uma camada atípica semelhante ao exosporo, porém distinta, que não se estende para a superfície do revestimento exterior (Plomp et al., 2005; Takamatsu, Watabe, 2002; Greenberg et al., 2010). O exosporo é fortemente hidrofóbico e esta é uma propriedade química que pode influenciar a dinâmica do fluxo em soluções aquosas (Greenberg et al., 2010).

Como há poucos relatos na literatura a respeito de estudos realizados com terapia fotodinâmica em esporos de *Bacillus* spp., avaliaram-se os resultados obtidos com outros métodos de desinfecção.

Uma classe de substâncias comumente usadas para destruir esporos são os agentes oxidantes, incluindo compostos como dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio e hipoclorito (McDonnell, Russell, 1999; Melly et al., 2002; Young, Setlow, 2003). Um agente oxidante adicional que tem um potencial significativo como um esporicida é o ozônio. O ozônio quando em solução aquosa tem um potencial oxidante superior a maioria dos agentes oxidantes utilizados (Kim et al., 2003; Young, Setlow, 2004).

Estudos realizados concluíram que a resistência dos esporos de *Bacillus* spp. ao peróxido de hidrogênio deve-se a alguns fatores, incluindo a camada proteica de revestimento (Riesenman, Nicholson, 2000), a pequena quantidade de água presente no core (Popham et al., 1995), a impermeabilidade relativa da membrana interna (Setlow, 2000) e a saturação do DNA de esporos (Melly et al., 2002).

Young e Setlow (2004) realizando estudos para determinar fatores de resistência e mecanismos de destruição de esporos de *Bacillus subtilis* através da utilização da água ozonizada, concluiu que,

sendo o principal fator na resistência o revestimento dos esporos, o ozônio não os destrói por danos no DNA, mas por alterações ocorridas no processo de germinação, provavelmente, ocasionadas por danificações da membrana interior. Assim, a membrana interior de esporos destruídos por ozônio é capaz de manter a sua integridade após um tratamento térmico. (Gunstone et al., 1994).

Segundo Weber et al. (2003) a higienização das mãos contaminadas com esporos de *Bacillus atrophaeus* utilizando-se álcool etílico 61% foi ineficiente na remoção ou inativação destes microorganismos, num tempo de 10, 30 e 60 segundos de assepsia. Os autores concluíram também que o cloro foi eficiente na eliminação dos esporos e o gluconato de clorexidina 2%, com excelente ação antimicrobiana para bactérias na forma vegetativa e vírus, não eliminou satisfatoriamente os esporos das mãos quando comparado com água e sabão antimicrobiano.

O que faz os esporos tão resistentes aos vários tratamentos?

Muitos fatores contribuem para a resistência dos esporos.

A primeira linha de defesa do esporo contra substâncias químicas tóxicas é o espesso revestimento proteico (Russell, 1990; McDonnell, Russell, 1999; Nicholson et al., 2000). Uma segunda barreira protetora é a membrana interior que tem baixa permeabilidade a pequenas moléculas hidrófilas e, assim, oferece maior proteção contra substâncias químicas tóxicas. O core dos esporos tem um teor de água extremamente baixo e este é de grande importância na resistência ao calor úmido (Gerhardt, Marquis, 1989). Além disso, no core, há pequenas proteínas, solúveis em ácido, que saturam e protegem o DNA dos esporos de danos causados pelo calor, radiação ultravioleta e alguns produtos químicos genotóxicos, como ácido nitroso (Setlow, 2000; Tennen et al., 2000).

Assim, como o revestimento dos esporos fornece a primeira linha de defesa contra enzimas e diversos produtos químicos (Driks, 1999; McDonnell, Russell, 1999; Riesenman, Nicholson, 2000; Tennen et al., 2000; Loshon et al., 2001; Genest et al., 2002), o córtex, formado por peptidoglicano, protege a membrana interna do esporo, tornando-se uma barreira importante à entrada de pequenas moléculas hidrofílicas para a porção central do core dos esporos (Nicholson et al., 2000). O core contém um grande depósito de piridina-2,6-dicarboxílico, ácido dipicolínico, (Paidhungat et al., 2000; Paidhungat, Setlow., 2002) que contribui para o estado inativado dos esporos e para a desidratação do core que confere resistência aos esporos quando submetidos ao calor úmido (Gerhardt, Marquis, 1989; Paidhungat et al., 2000; Setlow, 2000).

O elevado nível de resistência dos esporos provocou graves problemas na contaminação de edifícios que sofreram ataques de bioterrorismo e, ainda hoje, merece notável atenção nas indústrias alimentares e em ambientes hospitalares. Conseqüentemente, é de interesse significativo compreender os mecanismos eficientes de destruição ou inativação de esporos.

A ação da terapia fotodinâmica, realizando-se estudos com LASER e LED, assim como a comparação entre diferentes fotossensibilizadores em esporos bacterianos, justifica-se pela resistência que estas formas microbianas possuem aos tratamentos realizados para controle de micro-organismos.

Os resultados obtidos são extremamente importantes, pois os micro-organismos estudados não se apresentam na forma vegetativa, mas na forma esporulada que representa uma forma de resistência da bactéria para sobreviver. Assim, uma redução significativa dos esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* propõe tanto novo método de esterilização no controle ambiental quanto uma nova opção de tratamento de infecções ocasionadas por esporos de *Bacillus* spp.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- a) A terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno e verde malaquita, sob a ação do LASER de luz vermelho visível, no tempo de pré-irradiação de 10 minutos, foi eficaz em esporos de *Bacillus atrophaeus*;
- b) A terapia fotodinâmica mediada pelo rosa bengala e LED de luz verde, no tempo de pré-irradiação de 30 minutos, foi eficaz em esporos de *Bacillus atrophaeus*;
- c) A terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno e verde malaquita, sob a ação do LASER de luz vermelho visível, no tempo de pré-irradiação de 10 minutos, foi eficaz em esporos de *Bacillus subtilis*;
- d) A terapia fotodinâmica mediada pelo rosa bengala e LED de luz verde, no tempo de pré-irradiação de 30 minutos, foi eficaz em esporos de *Bacillus subtilis*;
- e) O efeito da terapia fotodinâmica depende do micro-organismo, do fotossensibilizador (concentração e localização na célula-alvo), tipo de fonte de luz e período de pré-irradiação.

8 REFERÊNCIAS

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74(5):656-69.

Alderman D.J. Malachite green: a review. *J Fish Dis.* 1985;(8)289-98.

Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *J Bacteriol.* 2005;187(11):3800-6.

Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios.* 1992;71(286):33-46.

Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RA. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):158-68.

Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and the future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004;5(8):497-508.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 26 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brovko LY, Meyer A, Tiwana AS, Chen W, Liu H, Filipe CD, et al. A novel method for sanitation of food handling and food processing surfaces. *J Food Prot* 2009;72(5):1020-4.

Burke SA, Wright JD, Robinson MK, Bronk BV, Warren RL. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(5):2786-90.

Canete M, Villanueva A, Juarranz A. Uptake and photoeffectiveness of two thiazines in HeLa cells. *Anticancer Drug Des*. 1993;8(6):471-7.

Carvalho JM, Flores CAT, Freitas JS, Giaretta VMA, Sant'Anna ALGG, Posso MBS. Aplicação do diodo emissor infravermelha no tratamento da dor fibromiálgica. *Rev Dor*. 2009;10(4):331-36.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag Photody Ther*. 2004;1(4):279-93.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18(1):51-5.

Cortezzo DE, Setlow P. Analysis of factors influencing the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J Appl Microbiol*. 2005;98(3):606-17.

Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, Loshon CA, Setlow B, Setlow P. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are immobile. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(20):7733-8.

Culp SJ, Beland FA. Malachite green: a toxicological review. *J Am Coll Toxicol*. 1996;15:219-38.

Dahl MK. *Bacillus*, Encyclopedia of food microbiology. Oxford, UK: Elsevier; 1999.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012;3:120. Epub 2012 Apr 10.

Daubenspeck JM, Zeng H, Chen P, Dong S, Steichen CT, Krishna NR, et al. Novel oligosaccharide chains of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Biol Chem.* 2004;279(30):30945-53.

Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6918-25.

Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(3):245-54.

Dias IF, Siqueira CP, Filho DO, Duarte JL, Laureto E, Lima FM, et al. Efeito da luz em sistemas biológicos. *Semina Tech Ex.* 2009;30(1):33-40.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163(1):1-12.

Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer* 1992;28A(10):1734-42.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(12):889-905.

Driks A. The *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(1):1-20.

Driks, A. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2002.

Emilio CR. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008.

Ergaieg K, Seux R. A comparative study of the photoinactivation of bacteria by *meso*-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. *Desalination*. 2009;246(1-3):353-62.

Fekrazad R, Bargrizan M, Sajadi S, Sajadi S. Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin® against *Streptococcus mutans* (an *in vitro* study). *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011;8(3): 249-53.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* 2002;29(8):724-35.

Garcez AS, Souza FR, Nuñez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2003;57(3):223-6.

Genest PC, Setlow B, Melly E, Setlow P. Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxy-nitrite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology*. 2002;148(Pt1):307-14.

Gerhardt P, Marquis R.E. Spore thermoresistance mechanisms. regulation of prokaryotic development. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1989.

Greenberg DL, Busch JD, Keim P, Wagner DM. Identifying experimental surrogates for *Bacillus anthracis* spores: a review. *Investig Genet*. 2010;1(1):4.

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. The lipid handbook. 3 ed. Boca Raton, FL: CRC Press;1994.

Hancock RE. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* 1997;5(1):37-42.

Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem and Photobiol.* 1992;55(1):145-57.

Hill RT, Straube WL, Palmisano AC, Gibson SL, Colwell RR. Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(5):1741-6.

Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 2010;28(4):1021-30.

Hunt DW. Rostaporfin (Miravant Medical Technologies). *IDrugs.* 2002;5(2):180-6.

Imparato JCP. Tratamento restaurador atraumático: técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença da cárie dentária. Curitiba: Editora Maio; 2005.

Ishikawa I, Sasaki KM, Aoki A, Watanabe H. Effects of Er: YAG laser on periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol.* 2003;5(1):23-8.

Ito T. Photodynamic agents as tools for cell biology. *Photochem Photobiol.* 1983;Rev 7:141-186.

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

Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SM, Jorge AO. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, and *Candida*. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(Suppl1):S67-72.

Kim JG, Yousef AE, Khadre MA. Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv Food Nutr Res.* 2003;45:167-218.

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

Kowaltowski AJ, Turin J, Indig GL, Vercesi AEC. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(6):581-90.

Kübler AC, Scheer M, Zöller JE. Photodynamic therapy of head and neck cancer. *Onkologie.* 2001;24(3):230-7.

Kurachi C, Melo CAS, Marcassa LG, Zílio CS, Bagnato VS, Cestari GA, et al. Implantação clínica da terapia fotodinâmica no Brasil: breve histórico e resultados avançados. *Rev Soc Bras Cancer.* 2002; 20:33-41.

Kuroiwa K, Nakayama H, Kuwahara T, Tamagawa K, Hattori K, Murakami K, et al. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(1):46-9.

Kuznetsova NA, Makarov DA, Kaliya OL, Vorozhtsov GN. Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. *J Hazard Mater.* 2007;146(3):487-91.

Lai EM, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, et al. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 2003;185(4):1443-54.

Lambrechts SA, Aalders MC, Langeveld-Klerks DH, Khayali Y, Lagerberg JW. Effect of monovalent and divalent cations on the photoinactivation of bacteria with meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol.* 2004;79(3):297-302.

Lanzafame RJ, Stadler I, Coleman J, Haerum B, Oskoui P, Whittaker M, et al. Temperature-controlled 830-nm low-level laser therapy of experimental pressure ulcers. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(6):483-8.

Loshon CA, Melly E, Setlow B, Setlow P. Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox. J Appl Microbiol. 2001;91(6):1051-8.

Lui H, Anderson RR. Photodynamic therapy in dermatology: Shedding a different light on skin disease. Arch Dermatol. 1992;128(12):1631-6.

Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas, Quim Nova. 2000;23(2):237-43.

Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy - A strategic review. Indian J Dent Res. 2010;21(2):285-91.

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

Manch-Citron JN, Lopez GH, Dey A, Rapley JW, MacNeill SR, Cobb CM. PCR monitoring for tetracycline resistance genes in subgingival plaque following site-specific periodontal therapy: a preliminary report. J Clin Periodontol 2000;27(6):437-46.

Marinho SA. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida* spp. e de células epiteliais: estudo *in vitro* [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

Martins BMR. Avaliação da eficácia terapêutica de uma nova modalidade de fototerapia utilizando diodo emissor de luz – LED [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2006.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147-79.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B. 2005;79(2):159-70.

Ochsner M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases. *Arzneimittelforschung*. 1997b;47(11):1185-94.

Oliveira A, Almeida A, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, et al. Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. *J Appl Microbiol*. 2009; 106(6):1986-95.

Oliveira-Nascimento L, Caricati AT, Abdulack-Lopes F, Neves LC, Caricati CP, Penna TC, et al. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. *Vaccine*. 2012;30(23):3351-4.

O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*. 2002;31(2):86-90.

Paidhungat M, Setlow B, Driks A, Setlow P. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J Bacteriol*. 2000;182(19):5505-12.

Paidhungat M, Setlow P. Spore germination and outgrowth. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2002.

Perussi JR. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. *Quím. Nova*. 2007;30(4):988-94.

Penna TC, Mazzola PG, Martins AM. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis*. 2001;1:16.

Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J*. 2001;15(3):612-7.

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*. 2003 24;39(1):17-22.

Piggot PJ. *Bacillus Subtilis*, Encyclopedia of microbiology. 3 ed. Oxford, UK: Academic Press; 2009.

Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(6):579-86.

Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Pitesky ME, Malkin AJ. *Bacillus atrophaeus* outer spore coat assembly and ultrastructure. *Langmuir*. 2005;21(23):10710-6.

Popham DL. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(3):426-33.

Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1):70-6.

Pukall R, Fritze D. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *Int J of Syst Evol Microbiol*. 2001;51(1):35-7.

Redmond C, Baillie LW, Hibbs S, Moir AJ, Moir A. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology*. 2004;150(Pt 2):355-63.

Riesenman PJ, Nicholson WL. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(2):620-6.

Rolim JP, de-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NA, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2012;106:40-6.

Russell AD. The bacterial spore and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(2):99-119.

Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(5):750-63.

Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA. Disinfection, preservation and sterilization. 3 ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications;1999.

Sagripani JL, Bonifacino A. Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):545-51.

Salva KA. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages and indications. *Clin Dermatol.* 2002;20(5):571-81.

Schäfer M, Schmitz C, Facius R, Horneck G, Milow B, Funken KH, et al. Systematic study of parameters influencing the action of rose bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. *Photochem Photobiol.* 2000;71(5):514-23.

Schnick RA. The impetus to register new therapeutants for aquaculture. *Prog Fish Cult.* 1988;50:190-6.

Setlow B, Loshon CA, Genest PC, Cowan AE, Setlow C, Setlow P. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *J Appl Microbiol.* 2002;92(2):362-75.

Setlow P. Bacterial stress responses. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2000.

Setlow P. Spore germination. *Curr Opinion Microbiol.* 2003;6(6):550-6.

Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* 2006;101(3):514-25.

Setúbal CA. Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2007.

Simplício FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 2002;25(5):801-7.

Skanavis C, Yanko WA. *Clostridium perfringens* as a potencial indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Mar Pollut Bull*. 2001;42(1):31-5.

Smijs TG, Schuitmaker HJ. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochem Photobiol*. 2003;77(5):556-60.

Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1998;42(10):2595-601.

Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite Green. *Aquat Toxicol*. 2004;66(3):319-29.

Sternberg ED, Dolphin D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 1998;54:4151-202.

Stratis-Cullum DN, Griffin GD, Mobley J, Vass AA, Vo-Dinh T. A miniature biochip system for detection of aerosolized *Bacillus globigii* spores. *Anal Chem*. 2003;75(2):275-80.

Takamatsu H, Watabe K. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(3):434-44.

Tardivo JP, Giglio AD, Oliveira, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2:175-91.

Tennen R, Setlow B, Davis KL, Loshon CA, Setlow P. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *J Appl Microbiol*. 2000;89(2):330-8.

Todd SJ, Moir AJ, Johnson MJ, Moir A. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. J Bacteriol. 2003;185(11):3373-8.

Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. J Photochem Photobiol. 1993;21(2-3):103-124.

Turnbough CL Jr. Discovery of phage display peptide ligands for species-specific detection of *Bacillus* spores. J Microbiol Methods. 2003;53(2):263-71.

Turro NJ. Modern molecular photochemistry. Mill Valley: University Science Books; 1991.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg Med. 2001;29(2):165-73.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. Lasers Surg Med. 2003;33(5):311-19.

Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev. 1992;56(3):395-411.

Vilela SF, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An *in vitro* study. Arch Oral Biol. 2011 [Epub ahead of print].

Vinck E, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. Lasers Med Sci. 2003;18(2):95-9.

Wagner SJ, Robinette D, Storry J, Chen XY, Shumaker J, Benade L. Differential sensitivities of viruses in red cell suspensions to methylene blue photosensitization. *Transfusion*. 1994;34(6):521-6.

Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Foley JW, Cincotta L. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol*. 1998;67(3):343-9.

Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;19(1):75-80.

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

Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2004;53(2):119-26.

Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000*. 1996;10:79-88.

Waller LN, Fox N, Fox KF, Fox A, Price RL. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods*. 2004;58(1):23-30.

Weber DJ, Bennett ES, Gergen MF, Rutala WA. Efficacy of selected hand hygiene agents used to remove *Bacillus atrophaeus* (a surrogate of *Bacillus anthracis*) from contaminated hands. *JAMA*. 2003;289(10):1274-7

Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(6):305-14.

Whitney EA, Beatty ME, Taylor TH Jr, Weyant R, Sobel J, Arduino MJ, et al. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(6):623-7.

Yamaoka K, Sasai R. Pulsed electric linear dichroism of triphenylmethane dyes adsorbed on montmorillonite K10 in aqueous media. *J Colloid Interface Sci*. 2000;225(1):82-93.

Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med*. 2002;30(1):60-6.

Young SB, Setlow P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J Appl Microbiol*. 2003;95(1):54-67.

Young SB, Setlow P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *J Appl Microbiol*. 2004;96(5):1133-42.

Young SB, Setlow P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone, two general decontaminants for biological agents. *J Appl Microbiol*. 2004;96(2):289-301.

APÊNDICE A - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus atrophaeus* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador azul de metileno e LASER.

Tabela 1 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,73	6,74	6,61	6,67
Placa 2	7,02	7,03	6,92	6,91
Placa 3	6,84	6,86	6,82	6,62
Placa 4	6,88	6,89	6,77	6,74
Placa 5	6,62	6,64	6,62	6,48
Placa 6	6,85	6,89	6,80	6,62
Placa 7	6,86	7,00	6,90	6,76
Placa 8	6,68	6,83	6,76	6,63
Placa 9	6,74	6,89	6,81	6,69
Placa 10	6,67	6,72	6,68	6,58
Média ± *DP	6,79 ± 0,12	6,85 ± 0,12	6,77 ± 0,11	6,67 ± 0,12

*DP: Desvio Padrão

Tabela 2 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,04	6,74	6,68	6,65
Placa 2	6,28	7,03	6,99	6,97
Placa 3	5,95	6,86	6,78	6,78
Placa 4	6,32	6,89	6,87	6,83
Placa 5	5,70	6,64	6,52	6,57
Placa 6	6,20	6,89	6,85	6,81
Placa 7	6,43	7,00	6,94	6,94
Placa 8	6,23	6,83	6,77	6,79
Placa 9	6,30	6,89	6,85	6,84
Placa 10	5,90	6,72	6,67	6,65
Média ± *DP	6,14 ± 0,23	6,85 ± 0,12	6,79 ± 0,14	6,78 ± 0,13

*DP: Desvio Padrão

Tabela 3 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,34	6,74	6,64	6,58
Placa 2	6,76	7,03	6,97	6,79
Placa 3	6,58	6,86	6,67	6,65
Placa 4	6,61	6,89	6,77	6,68
Placa 5	6,36	6,64	6,49	6,52
Placa 6	6,54	6,89	6,77	6,72
Placa 7	6,63	7,00	6,87	6,81
Placa 8	6,70	6,83	6,74	6,59
Placa 9	6,57	6,89	6,68	6,76
Placa 10	6,51	6,72	6,56	6,56
Média ± *DP	6,56 ± 0,13	6,85 ± 0,12	6,72 ± 0,14	6,67 ± 0,10

*DP: Desvio Padrão

APÊNDICE B - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus atrophaeus* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador rosa bengala e LED.

Tabela 4 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,26	6,74	6,75	6,54
Placa 2	5,85	7,03	6,89	6,68
Placa 3	6,32	6,86	6,46	6,45
Placa 4	6,30	6,89	6,57	6,54
Placa 5	6,56	6,64	6,60	6,45
Placa 6	6,04	6,89	6,60	6,57
Placa 7	6,45	7,00	6,80	6,72
Placa 8	6,34	6,83	6,62	6,65
Placa 9	6,28	6,89	6,88	6,56
Placa 10	6,18	6,72	6,62	6,58
Média ± *DP	6,26 ± 0,20	6,85 ± 0,12	6,68 ± 0,14	6,57 ± 0,09

*DP: Desvio Padrão

Tabela 5 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,08	6,74	6,89	6,34
Placa 2	6,18	7,03	6,89	6,53
Placa 3	6,04	6,86	6,79	6,56
Placa 4	6,32	6,89	6,88	6,32
Placa 5	6,28	6,64	6,75	6,53
Placa 6	6,08	6,89	6,62	6,41
Placa 7	6,18	7,00	6,81	6,54
Placa 8	6,00	6,83	6,62	6,58
Placa 9	6,18	6,89	6,64	6,34
Placa 10	6,11	6,72	6,76	6,59
Média ± *DP	6,14 ± 0,10	6,85 ± 0,12	6,77 ± 0,11	6,48 ± 0,11

*DP: Desvio Padrão

Tabela 6 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	5,30	6,74	6,74	6,49
Placa 2	5,60	7,03	6,94	6,18
Placa 3	0,00	6,86	6,81	6,26
Placa 4	5,60	6,89	6,62	6,34
Placa 5	5,48	6,64	6,64	6,38
Placa 6	5,00	6,89	6,80	6,28
Placa 7	5,70	7,00	6,86	6,11
Placa 8	5,60	6,83	6,60	6,41
Placa 9	5,30	6,89	6,59	6,32
Placa 10	0,00	6,72	6,81	6,40
Média ± *DP	4,36 ± 2,31	6,85 ± 0,12	6,74 ± 0,12	6,32 ± 0,11

*DP: Desvio Padrão

APÊNDICE C - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus atrophaeus* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador verde malaquita e LASER.

Tabela 7 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,63	6,74	6,70	6,71
Placa 2	6,94	7,03	7,02	6,99
Placa 3	6,70	6,86	6,84	6,83
Placa 4	6,79	6,89	6,86	6,86
Placa 5	6,56	6,64	6,63	6,64
Placa 6	6,74	6,89	6,88	6,85
Placa 7	6,86	7,00	6,97	6,96
Placa 8	6,68	6,83	6,82	6,81
Placa 9	6,77	6,89	6,88	6,86
Placa 10	6,63	6,72	6,71	6,65
Média ± *DP	6,73 ± 0,11	6,85 ± 0,12	6,83 ± 0,12	6,82 ± 0,12

*DP: Desvio Padrão

Tabela 8 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,30	6,74	6,73	6,73
Placa 2	6,65	7,03	7,02	7,01
Placa 3	6,49	6,86	6,85	6,85
Placa 4	6,45	6,89	6,89	6,88
Placa 5	6,18	6,64	6,64	6,63
Placa 6	6,47	6,89	6,88	6,88
Placa 7	6,57	7,00	6,99	6,99
Placa 8	6,45	6,83	6,83	6,82
Placa 9	6,38	6,89	6,89	6,88
Placa 10	6,36	6,72	6,70	6,71
Média ± *DP	6,43 ± 0,13	6,85 ± 0,12	6,84 ± 0,12	6,84 ± 0,12

*DP: Desvio Padrão

Tabela 9 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,71	6,74	6,70	6,73
Placa 2	6,99	7,03	6,98	7,00
Placa 3	6,85	6,86	6,84	6,85
Placa 4	6,80	6,89	6,86	6,89
Placa 5	6,57	6,64	6,61	6,64
Placa 6	6,88	6,89	6,86	6,87
Placa 7	6,99	7,00	6,94	6,98
Placa 8	6,81	6,83	6,80	6,78
Placa 9	6,82	6,89	6,88	6,88
Placa 10	6,68	6,72	6,65	6,71
Média ± *DP	6,81 ± 0,13	6,85 ± 0,12	6,81 ± 0,12	6,83 ± 0,12

*DP: Desvio Padrão

APÊNDICE D - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus subtilis* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador azul de metileno e LASER.

Tabela 10 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (5min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,40	6,76	6,43	6,57
Placa 2	6,53	6,70	6,56	6,49
Placa 3	6,59	6,48	6,46	6,61
Placa 4	6,64	6,74	6,30	6,56
Placa 5	6,52	6,66	6,60	6,45
Placa 6	6,60	6,62	6,60	6,43
Placa 7	6,45	6,57	6,53	6,48
Placa 8	6,56	6,57	6,62	6,54
Placa 9	6,49	6,58	6,54	6,53
Placa 10	6,36	6,38	6,62	6,54
Média ± *DP	6,51 ± 0,09	6,61 ± 0,12	6,53 ± 0,10	6,52 ± 0,06

*DP: Desvio Padrão

Tabela 11 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (10min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	5,95	6,76	6,69	6,92
Placa 2	5,48	6,70	6,63	6,34
Placa 3	5,78	6,48	6,58	6,26
Placa 4	5,70	6,74	6,69	6,52
Placa 5	5,90	6,66	6,43	6,63
Placa 6	5,90	6,62	6,46	6,34
Placa 7	5,85	6,57	6,57	6,36
Placa 8	5,70	6,57	6,53	6,69
Placa 9	5,85	6,58	6,68	6,61
Placa 10	5,78	6,38	6,38	6,48
Média ± *DP	5,79 ± 0,14	6,61 ± 0,12	6,56 ± 0,11	6,52 ± 0,20

*DP: Desvio Padrão

Tabela 12 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador azul de metileno (30min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,40	6,76	6,46	6,56
Placa 2	6,49	6,70	6,59	6,38
Placa 3	6,28	6,48	6,51	6,43
Placa 4	6,38	6,74	6,48	6,60
Placa 5	6,40	6,66	6,56	6,46
Placa 6	6,32	6,62	6,52	6,63
Placa 7	6,15	6,57	6,57	6,51
Placa 8	6,23	6,57	6,69	6,58
Placa 9	6,26	6,58	6,51	6,51
Placa 10	6,11	6,38	6,74	6,52
Média ± *DP	6,30 ± 0,12	6,61 ± 0,12	6,56 ± 0,09	6,52 ± 0,09

*DP: Desvio Padrão

APÊNDICE E - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus subtilis* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador rosa bengala e LED.

Tabela 13 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (5min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	5,30	6,76	6,43	6,56
Placa 2	5,30	6,70	6,56	6,38
Placa 3	5,30	6,48	6,46	6,23
Placa 4	5,60	6,74	6,30	6,30
Placa 5	5,78	6,66	6,60	6,28
Placa 6	5,00	6,62	6,60	6,11
Placa 7	5,48	6,57	6,53	6,08
Placa 8	5,78	6,57	6,62	6,26
Placa 9	5,60	6,58	6,54	6,36
Placa 10	5,85	6,38	6,62	6,52
Média ± *DP	5,50 ± 0,27	6,61 ± 0,12	6,53 ± 0,10	6,31 ± 0,15

*DP: Desvio Padrão

Tabela 14 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (10min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	5,60	6,76	6,69	6,36
Placa 2	5,48	6,70	6,63	6,08
Placa 3	5,48	6,48	6,58	6,26
Placa 4	5,00	6,74	6,69	6,18
Placa 5	5,00	6,66	6,43	6,20
Placa 6	5,48	6,62	6,46	6,34
Placa 7	5,00	6,57	6,57	6,04
Placa 8	5,30	6,57	6,53	6,28
Placa 9	5,30	6,58	6,68	6,32
Placa 10	5,70	6,38	6,38	6,00
Média ± *DP	5,33 ± 0,26	6,61 ± 0,12	6,56 ± 0,11	6,21 ± 0,13

*DP: Desvio Padrão

Tabela 15 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min) e LED; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador rosa bengala (30min); L+F-, LED

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	5,48	6,76	6,46	6,26
Placa 2	0,00	6,70	6,28	6,00
Placa 3	5,30	6,48	6,08	6,11
Placa 4	0,00	6,74	6,48	5,78
Placa 5	5,48	6,66	6,56	6,26
Placa 6	5,48	6,62	6,52	5,85
Placa 7	5,70	6,57	6,57	6,15
Placa 8	0,00	6,57	6,46	6,00
Placa 9	0,00	6,58	6,51	5,95
Placa 10	0,00	6,38	6,74	6,04
Média ± *DP	2,74 ± 2,89	6,61 ± 0,12	6,46 ± 0,18	6,04 ± 0,16

*DP: Desvio Padrão

APÊNDICE F - Tabelas com médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados em *Bacillus subtilis* nos diferentes grupos experimentais com o uso do fotossensibilizador verde malaquita e LASER.

Tabela 16 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (5min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,11	6,76	6,93	6,67
Placa 2	6,32	6,70	6,38	6,45
Placa 3	6,38	6,48	6,58	6,53
Placa 4	6,43	6,74	6,63	6,48
Placa 5	6,60	6,66	6,57	6,51
Placa 6	6,48	6,62	6,52	6,62
Placa 7	6,36	6,57	6,75	6,34
Placa 8	6,00	6,57	6,69	6,64
Placa 9	6,57	6,58	6,59	6,65
Placa 10	6,48	6,38	6,56	6,86
Média ± *DP	6,37 ± 0,19	6,61 ± 0,12	6,62 ± 0,15	6,58 ± 0,15

*DP: Desvio Padrão

Tabela 17 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (10min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,08	6,76	6,23	6,89
Placa 2	5,95	6,70	6,61	6,65
Placa 3	6,18	6,48	6,60	6,89
Placa 4	5,95	6,74	7,00	6,80
Placa 5	5,90	6,66	6,83	6,48
Placa 6	5,78	6,62	6,83	6,77
Placa 7	6,08	6,57	6,64	6,72
Placa 8	5,85	6,57	6,87	6,54
Placa 9	6,00	6,58	6,89	6,74
Placa 10	5,95	6,38	6,66	6,69
Média ± *DP	5,97 ± 0,12	6,61 ± 0,12	6,72 ± 0,22	6,72 ± 0,13

*DP: Desvio Padrão

Tabela 18 - Médias e desvios padrões de UFC/mL(Log₁₀) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais: L+F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min) e LASER; L-F-, grupo controle; L-F+, fotossensibilizador verde malaquita (30min); L+F-, LASER

Ensaio	L+F+	L-F-	L+F-	L-F+
Placa 1	6,58	6,76	6,85	7,04
Placa 2	6,45	6,70	6,75	6,90
Placa 3	6,52	6,48	6,81	6,80
Placa 4	6,64	6,74	6,40	6,65
Placa 5	6,63	6,66	6,59	6,49
Placa 6	6,59	6,62	6,41	6,76
Placa 7	6,43	6,57	6,51	6,51
Placa 8	6,52	6,57	6,64	6,63
Placa 9	6,46	6,58	6,11	6,45
Placa 10	6,36	6,38	6,51	6,38
Média ± *DP	6,52 ± 0,09	6,61 ± 0,12	6,56 ± 0,22	6,66 ± 0,21

*DP: Desvio Padrão