

Fernando Luis Esteban Florez

TERAPIA FOTODINÂMICA EM
MICRORGANISMOS CARIOGÊNICOS –
ESTUDO *IN VITRO*



Araraquara

2012

Fernando Luis Esteban Florez

TERAPIA FOTODINÂMICA EM
MICRORGANISMOS CARIOGÊNICOS –
ESTUDO *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor, em Ciências Odontológicas

ORIENTADOR: OSMIR BATISTA DE OLIVEIRA JÚNIOR

Araraquara

2012

CURRÍCULO

FILIAÇÃO

Francisco Esteban Gallego

Maria De La Cruz Florez Esteban

NASCIMENTO

12/01/1978 – São Paulo – SP.

1999 – 2002

Graduação em Odontologia pela Universidade de Marília - UNIMAR

2003 – 2006

Pesquisador colaborador do Instituto de Física de São Carlos

2007 – 2009

Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora – Nível de Mestrado –
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista –
UNESP/ SP.

2009 – 2012

Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora – Nível de Doutorado –
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista –
UNESP/ SP.

A Deus, pela minha vida maravilhosa, pela minha família espetacular, pelo amor, pelo saber e por todos que de forma direta ou indireta me ajudaram nesta caminhada.

Aos meu pais, Francisco e Mary, por serem um grande exemplo de retidão, perseverança, humildade e dedicação. Por me apoiarem de maneira incondicional em todos os momentos de minha vida, por sempre me incentivar nos momentos em que fraquejei e por comemorar ao meu lado os meus momentos de vitória.

A minha esposa, Ana Paula, que além de ser uma mulher linda, inteligente, amiga e companheira dedicada, é muito especial na minha vida. Você me faz muito feliz e me completa em tudo!!!!. Obrigado pela tolerância, paciência, apoio incondicional, amor sem fim e por todos os momentos de longas conversas, risos e lágrimas que sempre foram fundamentais em nossas vidas. **TE AMO!!** 

Ao meu irmão, Ricardo, que sempre dividiu comigo as batalhas desta vida, que sempre esteve ao meu lado. Obrigado por tudo que me ensinou e por ser uma referência em minha vida!!!!.

Á VOCÊS DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

OSMIR, muito obrigado pelo exemplo, pela sinceridade, honestidade, amizade e orientação que teve, para comigo, durante a minha trajetória na pós-graduação. Acho que conseguimos com este trabalho, contribuir com mais um tijolinho na torre do conhecimento!!!!. **OBRIGADO MESTRE!!!!!!**

VANDERLEI, você é o grande responsável pela intensa mudança ao qual passei em minha vida, você me fez acreditar que tudo isto era possível. Através dos **SEUS EXEMPLOS**, você me fez acreditar que posso sempre ser sempre alguém melhor, **MUITO OBRIGADO** pelos puxões de orelha, orientações, discussões e pela amizade sincera que tivemos até agora.

MARCELO FERRAREZI, EDSON CAMPOS E JOSÉ SAAD, obrigado pela intensa contribuição para a minha formação profissional por meio das diversas disciplinas, cursos e clínicas que tivemos. Obrigado por sempre me auxiliarem e me motivarem, sem vocês este trabalho não seria completo.

SÉRGIO SALVADOR, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, da Universidade de São Paulo – USP, por toda a colaboração, atenção e amizade que foram construídas durante a execução deste trabalho.

JULIANE TANOMARU E NORBERTO, muito obrigado por executarem comigo grande parte deste trabalho, sem vocês teria sido impossível este trabalho ter chegado ao seu final.

CREUZA, APARECIDA E CONCEIÇÃO, obrigado por toda a dedicação, carinho e momentos de descontração que tivemos juntos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa de seu Diretor, o Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla, e sua Vice- Diretora, a Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montadon.

Aos docentes da Disciplina de Dentística Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Osmir Batista de Oliveira Júnior, Marcelo Ferrarezi Andrade, José Roberto Cury Saad e Edson Alves de Campos por toda a dedicação e carinho que tiveram comigo.

A todos os membros e funcionários do Grupo de Óptica, do Instituto de Física de São Carlos, nas pessoas dos amigos Vitor Hugo Panhóca e Fernanda Paolillo pela amizade e dedicação que tiveram comigo durante a execução deste trabalho.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Adriano, Eliane, Inês, Maria Helena, Maria José e Silvia pela atenção e carinho com que sempre me atenderam e em especial à Ceres, pela correção deste trabalho.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA – BREVE HISTÓRICO.....	22
1.2 FOTOSSENSIBILIZADORES (FS).....	24
2 PROPOSIÇÃO	33
3 CAPÍTULO 1.....	34
4 CAPÍTULO 2.....	72
5 CAPÍTULO 3.....	96
6 DISCUSSÃO GERAL.....	122
7 CONCLUSÃO GERAL.....	135
7.1 TRABALHOS FUTUROS	135
8 REFERÊNCIAS *.....	136

Esteban Florez FL. Terapia Fotodinâmica em microrganismos cariogênicos – Estudo in vitro. [Tese de doutorado]. Araraquara:

RESUMO

O uso indiscriminado dos antibióticos e seu mecanismo de ação levaram ao desenvolvimento de cepas bacterianas altamente resistentes e de maior virulência. Estas cepas causam doenças muito mais agressivas e de difícil tratamento, constituindo-se um dos principais desafios enfrentados por profissionais da área da saúde. Como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) baseia seu mecanismo de ação em reações oxidativas não específicas, esta passou a ser uma alternativa interessante para o tratamento de todas as doenças de origem microbiana, uma vez que, nem bactérias, nem vírus ou fungos tem capacidade de desenvolver resistência a TFDA. Considerando que a carie dental é uma doença de origem bacteriana específica e que a eficácia da TFDA depende do tipo e dose de energia luminosa utilizada, do fotossensibilizador e da taxa de oxigênio nos tecidos a serem tratados, decidimos investigar a viabilidade da TFDA para prevenção e tratamento da cárie dental. Para tal, foram realizados 3 estudos: 1) Revisão crítica da literatura sobre fotossensibilizadores utilizados para controle antimicrobianos de *Streptococcus mutans*. 2) Avaliação do efeito antibacteriano de três fotossensibilizadores (curcumina, hipericina e hematoporfirina) sobre *Streptococcus mutans* em suspensões planctônicas e 3) Avaliação do efeito antibacteriano de três fotossensibilizadores (curcumina, hipericina e photogem[®])

sobre biofilme maduro formado a partir de cepa de *Streptococcus mutans*. Dos fotossensibilizadores utilizados a hipericina foi a que apresentou maior efeito antimicrobiano sobre suspensão planctônica. Foi comprovado que a eficácia da TFDA esta diretamente relacionada com o tipo e dose de energia utilizada, com o tipo e concentração do fotossensibilizador e com o tempo de aplicação da terapia. Nenhuma das terapias utilizadas mostrou efetividade sobre biofilme maduro, demonstrando a necessidade de mais trabalhos sobre a aplicação da TFDA para tratamento da cárie dental.

Palavras chave: Fotoquimioterapia, microbiologia, Cárie dentária, *Streptococcus mutans*, Descontaminação

* Descritores cadastrados - bireme: www.bireme.br

Esteban Florez FL. Photodynamic Therapy in cariogenic microorganisms – In vitro study. [Tese de doutorado]. Araraquara:

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics and its mechanisms of action led to the development of highly resistant bacterial strains and more virulent ones. These strains can cause diseases much more aggressive and difficult to treat, and in that way they consist in one of the major challenges to the health care professionals. As the antimicrobial photodynamic therapy (APDT) it is based on non-specific oxidative reaction, this is now considered as an interesting alternative to treat all diseases from bacterial origins, once that, neither bacterias, neither viruses nor fungi can develop acquired resistance from the therapy. Taking into consideration that dental caries is a specific bacterial disease and that the APDT's efficiency is directed related to factors as, wavelength, energy dose, photosensitizer used, and with the oxygen present in the target tissue, we have decided to investigate the APDT to prevent and treat dental decay. To accomplish that, it was realized three studies: 1) Critical Literature revision about photosensitizers used to control *S.mutans*. 2) Evaluation of the antimicrobial effect of three different photosensitizers (Curcumin, Hypericin and Hematoporfirin) over *Streptococcus mutans* in planktonic cultures and 3) Evaluation of the antimicrobial effect of three photosensitizers (Curcumin, Hypericin and Hematoporfirin) over mature biofilms obtained from *Streptococcus mutans* strains. From the photosensitizers used Hypericin was the one that showed the most antibacterial observed effect on

the planktonic cultures. It was demonstrated by our data that the APDT efficacy is directly related to the time of irradiation of the samples, with the kind of photosensitizer used, its concentration and with the energy dose delivered. None of the proposed protocols were able to show any significant effect over the microorganisms when in biofilm phase demonstrating in that way the necessity of realization of more scientific studies to be able to be used as a treatment for dental decay.

Key words: Photochemotherapy, microbiology, Dental caries, *Streptococcus mutans*, Decontamination.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária, ainda hoje, figura entre as mais significativas doenças que acometem o ser humano, e o principal motivo deve-se ao fato de esta doença apresentar uma alta prevalência, podendo afetar percentuais acima de 95% nas mais diversas populações mundiais⁷. No ano de 2003, o Projeto Saúde Bucal Brasil, foi concluído com o intuito de produzir informações sobre as condições de saúde bucal da população brasileira, além de criar uma base de dados eletrônica relativa aos principais problemas enfrentados nessa área. Este estudo demonstrou que cerca de 90% da população brasileira de 15 a 19 anos apresenta pelo menos um dente permanente com experiência de cárie⁸.

A cárie é uma doença invasiva, crônica, transmissível e que promove a desmineralização do dente seguido da destruição da fase orgânica da estrutura cristalina. Este processo resulta da colonização da superfície do esmalte por microrganismo – especialmente o *Streptococcus mutans* - que, metabolizando carboidratos fermentáveis (sacarose, p.ex.), produzem ácidos^{57,95}. Esta acidez localizada é provocada pela disponibilidade de açúcar e leva à dissolução do fosfato de cálcio das camadas superficiais da estrutura de esmalte, liberando assim fosfato e cálcio para o meio bucal¹⁵. A partir da determinação de um momento essa perda atinge tal grau que se observa a formação de uma cavidade, cuja evolução, pode levar a completa destruição da coroa dentária.

Durante a evolução do processo carioso, a camada mais externa ou superficial, é caracterizada pela presença de um tecido amolecido, desorganizado

e úmido. Segundo Consolaro¹⁷ (1996), é possível se distinguir clinicamente dois tipos de dentina no sentido da propagação do processo carioso (da superfície para a polpa).

A primeira e mais superficial, é a dentina infectada⁶⁶, esta é caracterizada por apresentar consistência bem amolecida e cores clinicamente observáveis que variam do amarelado até ao amarronzado. Nesta camada, existem aproximadamente 10^8 bactérias por grama³⁸ sendo que, estas são em sua maioria proteolíticas; microscopicamente se observa um material granuloso, eosinófilo e em quase na sua totalidade sem preservação estrutural. A segunda camada é a zona de dentina desmineralizada superficial⁶⁶, esta se encontra mais profundamente á zona necrótica e é caracterizada principalmente pela deformação da morfologia canalicular e manutenção da matriz orgânica. Os canalículos apresentam-se dilatados e obstruídos por microrganismo, apresentando varicosidades e focos de liquefação longitudinais e transversais.

Mais abaixo às duas zonas previamente descritas, encontra-se a dentina contaminada⁶⁶, que já se localiza fora do alcance visual do operador e que tem por principal característica, a distorção da estrutura cristalina. Nesta região, a população bacteriana pode alcançar em média o volume de 10^5 bactérias por grama³⁸ sendo que em sua maioria estas são de caráter acidogênico; o aspecto superficial do tecido se assemelha á textura do couro e pode ser considerada passível de remineralização devido á grande preservação estrutural nesta região.

Em meio à dentina contaminada existe ainda uma região que é classificada como zona de dentina hipermineralizada, esta é constituída da zona desmineralizada profunda, da zona de esclerose dentinária e finalmente da zona de dentina reacional. Na zona de dentina desmineralizada profunda, a matriz canalicular encontra-se preservada e intacta. A presença bacteriana pode ser detectada, embora seja pouco freqüente. Macroscopicamente essa dentina apresenta-se seca e com coloração acastanhada⁶⁶.

A cárie é considerada como uma doença que depende de vários fatores (multifatorial) e, principalmente, da relação entre estes fatores. Estes estão relacionados com os microrganismos presentes, o tipo de substrato e por fim as características intrínsecas do hospedeiro, de maneira que, para que o início da doença seja desencadeado é necessária a presença concomitante de todos estes fatores⁹. Este modelo de apresentação da doença cárie ficou amplamente conhecido na literatura como Tríade de Keyes⁴⁶ e ainda hoje é bastante aceito e divulgado. Mais recentemente, um quarto fator foi acrescentado a esta tríade, uma vez que se acredita que o fator tempo seja extremamente importante no desenvolvimento da cárie⁷⁰.

Em seguida ao desenvolvimento de novas técnicas e métodos para avaliação da cárie foi concluído que biofilme é o único fator verdadeiramente relacionado com o surgimento do processo cariioso. As bactérias presentes, a dieta, as características da saliva do hospedeiro foram classificados como determinantes e os fatores sociais – classe social, educação e renda – foram classificados como fatores de confusão.

O biofilme dentário (Figura 1) se deposita em condições usuais sobre a superfície do esmalte dentário ou de outras superfícies duras (restaurações, p.ex.) que não descamam na boca², e quando associado a um consumo freqüente de carboidratos fermentáveis, algumas espécies bacterianas dos tipos acidogênicas e acidúricas são selecionadas e produzem grandes quantidades de ácido, em especial o ácido láctico, que reduz o pH da interface biofilme/dente.

O tempo no qual o ácido permanece em contato com a superfície do esmalte, proporciona sucessivas desmineralizações de sua estrutura cristalina levando ao colapso da estrutura, isto caracteriza o início deste processo que se localiza inicialmente no esmalte; Uma vez que o processo cariioso esteja instalado o esmalte sofre alterações físico-químicas que mudam as suas propriedades mecânicas, estéticas e ópticas.

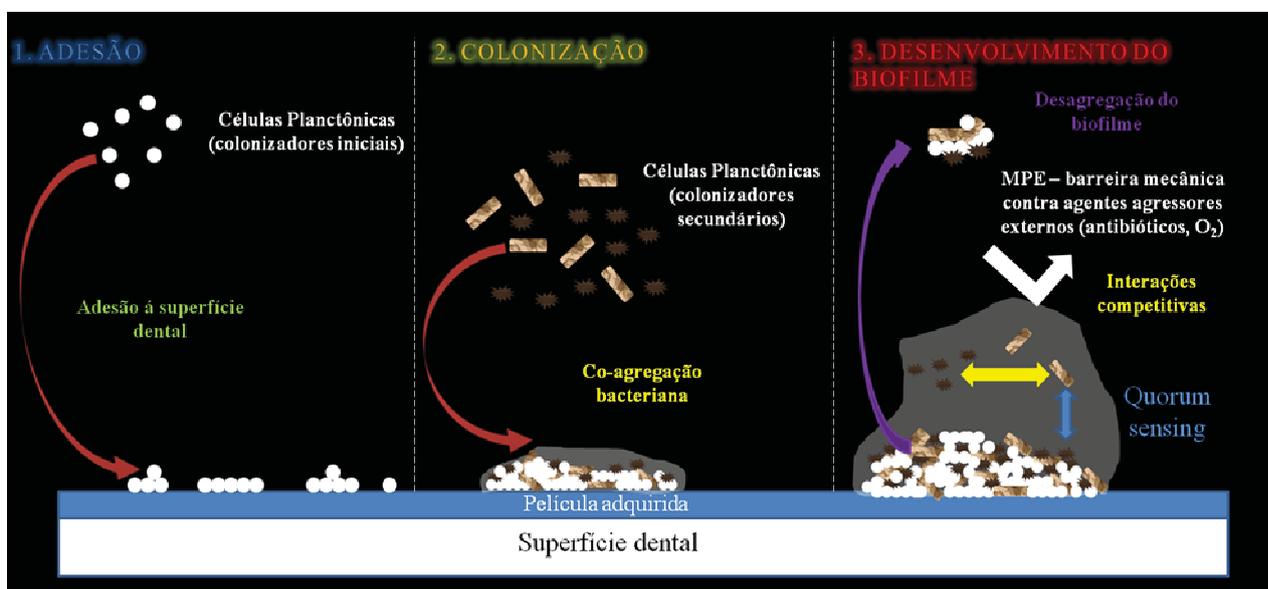


FIGURA 1- Desenho esquemático que representa o processo de adesão, colonização e desenvolvimento do biofilme dentário.

O esmalte tem uma composição basicamente inorgânica, aproximadamente 95% de sua composição, a estrutura deste tecido se apresenta tridimensionalmente como um sólido poroso e semi-translucido, que quando atacado pelo processo cariioso, sofre um aumento nos espaços interprismáticos aumentando assim a sua porosidade. Com o aumento considerável desta, o esmalte passa a apresentar um aspecto esbranquiçado devido á desidratação do tecido e conseqüente a substituição das moléculas de água por ar em seu interior ⁹³.

A dentina é o tecido que se localiza mais profundamente ao esmalte, contém maiores quantidades de água e de material orgânico – 12% e 18%, respectivamente – e por esse motivo, apresenta características bastante diferentes do esmalte, é um tecido um tanto quanto resiliente devido á grande quantidade de túbulos dentinários que dissipam as forças incidentes, serve de suporte para o esmalte e reduz o risco de fratura; esta é avascular e não apresenta células em seu interior, com exceção dos prolongamentos dos odontoblastos que se localizam no interior dos túbulos dentinários quando a cárie atinge a interface esmalte/dentina ocorre uma ampla disseminação de bactérias, bem como dos produtos que são resultado do metabolismo bacteriano, isto aumenta de maneira considerável a área de contato destes com os tecidos circunvizinhos.

À medida que a lesão progride é possível se observar que, a lesão resultante assume a forma de cone com a base na interface esmalte/dentina e ápice voltado para a polpa ^{17,71}.

Em função a esta agressão, o organismo reage e tende a depositar uma dentina mais densa e que possa resistir de forma mais efetiva ao ataque bacteriano, este tecido é chamado de dentina esclerosada ou dentina terciária.

De forma didática a dentina pode ser classificada, no sentido da evolução do processo carioso quanto á presença de bactérias e organização como segue (Figura 2).



FIGURA 2- Esquema de classificação da dentina na evolução do processo carioso.

A dentina infectada esta irreversivelmente comprometida devido à grande presença de bactérias sendo imperativa a sua completa remoção^{17,50}, enquanto que, a dentina contaminada pode ser mantida caso receba o tratamento adequado^{68,69}. Na rotina clinica diária é um desafio para o profissional da odontologia o reconhecimento de maneira visual ou tátil de cada uma destas regiões. Os métodos existentes mais utilizados, ainda continuam sendo a cor e a dureza do tecido dentinário, mas diversos trabalhos criticam a utilização da cor como critério auxiliar na remoção do tecido cariado, uma vez que, não existe uma

relação direta entre a cor e a quantidade ou ainda a qualidade das bactérias presentes na cavidade.

A dureza do tecido é um critério auxiliar mais seguro, pois este oferece maior resistência aos instrumentos manuais e rotatórios em função do contato destes com áreas de maior sanidade tecidual⁵². Ainda assim é muito difícil a correta diferenciação entre a dentina infectada e a dentina afetada apenas por métodos táteis, porque estes são dependentes de fatores como a afiação do instrumental, a força aplicada ao instrumento e a maneira de se aplicar o instrumental⁹. Por estes motivos é que os métodos de diagnóstico por imagens como os raios X, o uso de corantes específicos para a dentina cariada, ou ainda as novas tecnologias como o *LASER*, surgiram de maneira a complementar a experiência do profissional na realização correta do diagnóstico seguida da remoção mais precisa de tais tecidos.

O método radiográfico permite visualizar a presença de alterações de composição da estrutura cristalina, que na imagem, é representada por áreas radiolúcidas de maior ou menor intensidade dependendo do tamanho da lesão de cárie, no entanto, tal técnica é limitada e não permite qualificar o tecido. Por este motivo, o método de diagnóstico por RX é utilizado apenas para observar a presença, os limites da lesão e ainda, pode ser utilizado como um método de controle da progressão da lesão através da comparação de imagens obtidas em diferentes tempos^{60,96}.

As técnicas que utilizam corantes para evidenciar a dentina cariada foram propostas para identificar a dentina infectada. Vários tipos de corantes foram propostos, entre eles se encontram a fucsina e o vermelho ácido^{34-36,44,50,51,73,74}. A fucsina foi amplamente utilizada na odontologia, e teve a sua capacidade de identificar a dentina cariada reconhecida em diversos trabalhos científicos^{35,36,44}, mas o seu potencial carcinogênico, bem como, a existência de trabalhos na literatura que criticam a sua utilização por esta corar áreas além da dentina infectada, fez com que este método auxiliar de diagnóstico caísse em desuso.

Recentemente com o surgimento de novas tecnologias aplicadas à odontologia, surgiram novas possibilidades para auxiliar o profissional no correto diagnóstico da lesão de cárie, entre elas, podemos citar a condutância elétrica, o retroespalhamento e a fluorescência induzida (QLF – Quantitative Light Fluorescence - Inspektor Research Systems, Amsterdam, Netherlands). O DIAGNOdent[®] (KaVo Dental, Biberach, Germany) , é um equipamento que tem o seu funcionamento baseado no conceito físico de interação da luz com a matéria, este se utiliza de um feixe de *LASER* de baixa intensidade para realizar o diagnóstico. O *LASER* gerado pelo equipamento, é absorvido tanto pela porção orgânica quanto pela porção inorgânica do dente, bem como, pelas bactérias e subprodutos destas. Em presença de cáries o equipamento detecta a fluorescência emitida pelo tecido e quantifica a intensidade de luz em uma escala numérica digital.

Quando do surgimento desta tecnologia – por volta de 1998 – os primeiros trabalhos na literatura indicavam este como um método bastante promissor. A

maioria dos estudos disponíveis que utilizam o DIAGNOdent[®] (KaVo Dental, Biberach, Germany) foram realizados *in vitro*^{49,76,86,87} e *in vivo*^{8,78}, e foram direcionados principalmente para o diagnóstico em esmalte, e obtiveram resultados que indicam tal equipamento como sendo um método auxiliar de grande valia. Poucos trabalhos avaliaram o sistema de fluorescência para mensuração da cárie em dentina^{53,78,79,82}, mas a literatura disponível corrobora a utilização deste tipo de sistema também para dentina.

Uma vez detectado a presença de tecido cariado, inicia-se a remoção deste através da utilização de brocas em baixa rotação, podendo ter a sua ação complementada com a utilização de instrumentos cortantes manuais (colher de dentina, p.ex.). Quando da utilização de tais instrumentos, cuidados devem ser tomados durante a execução da remoção do tecido cariado, uma vez, que tais procedimentos podem interferir de forma significativa na vitalidade pulpar do elemento dental. Desta forma, se tornou necessário o desenvolvimento novos métodos, técnicas e tecnologias aplicadas para se remover a cárie de forma mais eficiente, indolor e segura. Esta problemática levou à criação de sistemas baseados em agentes químicos-mecânicos (CarieSolv[®]-MediTeamDental, Medicinaregatan, Göteborg, Sweden, p.ex.) e físicos (LASER, abrasão a ar, ultrassom) que atendam a estas novas exigências.

Alguns autores discutem ainda sobre a real necessidade em se remover de maneira completa ou parcial a dentina cariada, seguida do selamento desta cavidade com um material restaurador que, deve promover de forma efetiva o isolamento completo das bactérias remanescentes, de maneira a provocar sua

morte por incapacidade de estas captarem nutrientes do meio bucal^{1,30,43,48,65}.

Evidências científicas mostram que este tipo de abordagem não só paralisa o processo de evolução da cárie, como também, cria condições para que ocorra uma possível remineralização do tecido cariado remanescente^{30,43,48,61,65}. Outros trabalhos afirmam que até o presente momento, não existem métodos ou estratégias disponíveis que removam completamente a população bacteriana que ora tenha se instalado no elemento dental.

Por este motivo, é bastante oportuno e necessário que, novas técnicas e tecnologias sejam desenvolvidas e aplicadas nas mais diversas áreas da odontologia e, em especial para a Dentística Restauradora, de maneira a se conseguir um tratamento efetivo da doença cárie que seja altamente seletivo, evitando a remoção de tecido dentinário sadio, e ainda contribuindo significativamente para reduzir a ocorrência de possíveis recidivas do processo carioso.

1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA – BREVE HISTÓRICO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que surgiu nos primórdios do século XX com Oscar Raab, que em 1900 percebeu durante os seus estudos relacionados com o tratamento da malária que, alguns dos microrganismos unicelulares presentes – Paramecia - morriam quando expostos a luz do sol e ao ar na presença de corantes como a acridina⁶⁹. Com a necessidade do desenvolvimento de técnicas menos invasivas, para o tratamento de tumores em humanos, em 1903, Tappenier, Jodlbauer⁹⁸, realizaram as primeiras experiências

utilizando a eosína como agente fotossensibilizador para verificar o efeito fotodinâmico deste corante em tais lesões, que apesar de obterem bons resultados as suas pesquisas não tiveram continuidade.

Em 1924, Policard⁸¹ tendo como base estudos prévios decidiu estudar a interação das porfirinas com os tecidos de maneira em geral, e em especial com os tecidos que compõe os tumores malignos²⁶, e observou que, estas tendem a se acumular mais intensamente nos tecidos alterados, o que evidencia uma seletividade natural da droga pelo tecido, além disso, observou que as porfirinas são completamente atóxicas, mas que na presença de luz visível e oxigênio as porfirinas assumem um caráter altamente tóxico ao tecido celular levando à destruição localizada do tecido vivo anormal mediante a sua necrose. As porfirinas possuem ainda a capacidade de atuar na morte de bactérias e fungos através de sua inviabilização.

No final dos anos 60, pesquisadores fizeram o primeiro relato de caso onde descreveram o tratamento bem sucedido de um câncer de seio que foi tratado com derivados de hematoporfirina e irradiação seletiva do tumor com luz visível⁵⁴. Em 1976 pesquisadores postularam que o oxigênio singleto gerado pela sensitização, a partir da transferência de energia do fotossensibilizador era o agente citotóxico responsável pela destruição celular dos tumores²⁷. Já no final dos anos 70 a terapia fotodinâmica passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer além de outras condições clínicas^{45,83, 88}.

1.2 FOTOSSENSIBILIZADORES (FS)

Diversos compostos químicos de origem orgânica ou sintética podem apresentar características químicas, físicas e biológicas interessantes para a terapia fotodinâmica, mas, para que um composto possa ser considerado como um fotossensibilizador ideal, este deve ser biocompatível com os tecidos saudáveis, ter pico máximo de absorção dentro da “janela biológica”, ter rendimento quântico adequado, custo reduzido, viabilidade comercial, foto-estabilidade, alta solubilidade em água ou em derivados do sangue, alta produção de oxigênio singlete e baixos níveis de efeitos colaterais (ex. citotoxicidade, grande acumulação nos tecidos provocando fotosensibilidade).

Os fotossensibilizadores são classificados didaticamente em três gerações – primeira geração, segunda geração e terceira geração. Esta classificação surgiu em função da cronologia do aparecimento e utilização de tais drogas, bem como, das alterações a que estas foram submetidas ao longo do tempo.

1.2.1 FOTOSSENSIBILIZADORES DE PRIMEIRA GERAÇÃO

As hematoporfirinas (Hp) e os derivados de hematoporfirinas (HpD) foram, na década de 1970, os fotossensibilizadores mais utilizados na terapia fotodinâmica e são considerados como drogas de primeira geração. As principais drogas desta geração são o Photogem® (Timtec Corp., Newark, USA) e o Photofrin®²³ (Figura 3).

São compostos obtidos através da sintetização do sangue de humanos e animais a partir da protoporfirina IX (HpIX) que esta presente na circulação^{14,37},

são drogas constituídas por uma mistura de no mínimo sete porfirinas oligômeras que estão ligadas entre si por ligações éter ou éster^{44,47}, e que apresentam entre outras características, fortes propriedades lipofílicas e hidrofílicas.

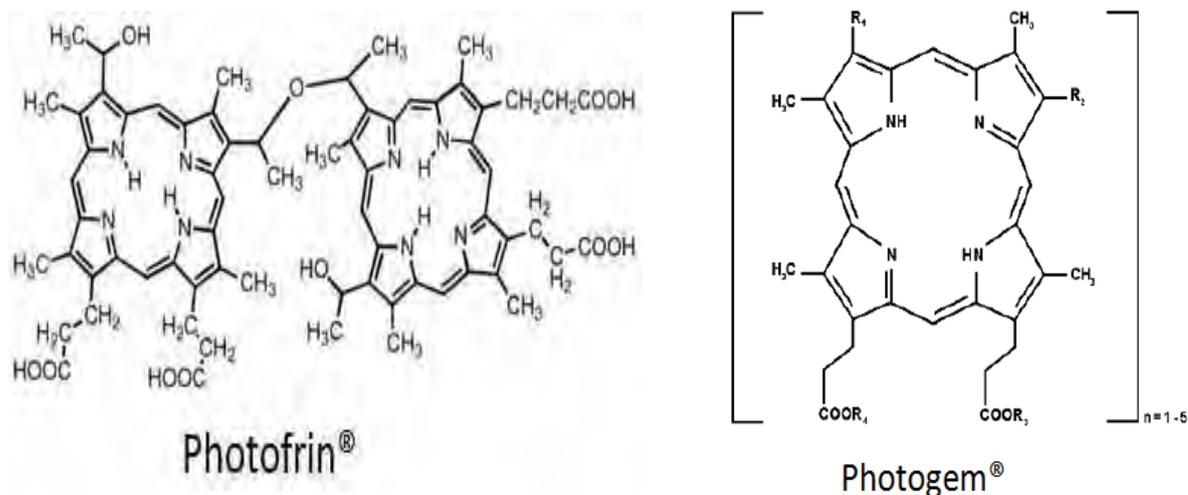


FIGURA 3- Fórmula estrutural do Photofrin® e Photogem – derivado de hematoporfirina – Primeira geração.

Tipicamente as porfirinas apresentam cinco principais bandas de absorção (Figura 4) frente às radiações eletromagnéticas, a principal, e mais intensa destas, se encontra na região do UV-A com pico máximo de absorção por volta de 380nm, e é conhecida como banda de Soret. As outras quatro bandas são conhecidas como bandas-Q, tem menor intensidade e estão localizadas em comprimentos de onda na região visível do espectro eletromagnético, o que do ponto de vista clínico é uma grande vantagem quando comparado ao ultravioleta⁸.

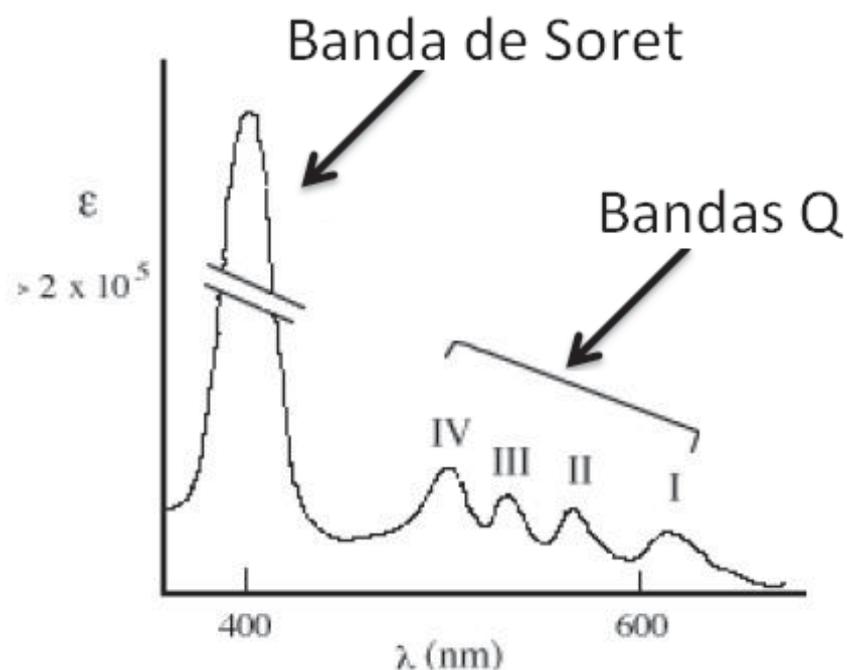


FIGURA 4- Espectro típico de absorção no UV-VIS das porfirinas. (M. Prushan, 2005)

Apesar de serem drogas eficazes para a terapia fotodinâmica em diferentes tipos de tumores, estes fotossensibilizadores não são considerados como ideais, uma vez que, apresentam forte acumulação em tecidos como a derme e a epiderme por um período que pode variar de quatro até oito semanas, baixo coeficiente de extinção molar na faixa de absorção de 630 nm, além de apresentar um alto índice de impurezas. Estas impurezas podem ser conhecidas também como agregados ou dímeros, e são provenientes do próprio processo de obtenção destes fármacos. Alguns trabalhos estudaram a influência destas na terapia fotodinâmica através de análise cromatográfica em tumores, e os seus resultados

demonstraram que, em sua maioria, as impurezas é que eram retidas nos tumores por meio de um processo de monomerização dentro das células tumorais⁴⁰.

1.2.2 FOTOSSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GERAÇÃO

Em função das limitações e problemas associados com a utilização das drogas de primeira geração, os pesquisadores criaram novas técnicas de maneira a desenvolver fármacos que pudessem superar as dificuldades e limitações das drogas de primeira geração. As principais drogas de segunda geração (Figura 4) são as ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas e as purpurinas.

Ao contrário das porfirinas que são obtidas a partir de origem orgânica, estes fotossensibilizadores são sintetizados quimicamente em laboratório por meio de processos altamente controlados que resultaram na obtenção de substâncias extremamente puras, que apresentam características que se assemelham mais a um fotossensibilizador ideal, como por exemplo, o deslocamento do pico de absorção em comprimentos de onda maiores (650nm – 850nm), alta produção de oxigênio singlete, baixa acumulação tecidual, etc. Atualmente diversos fotossensibilizadores de segunda geração continuam em experimentação clínica.

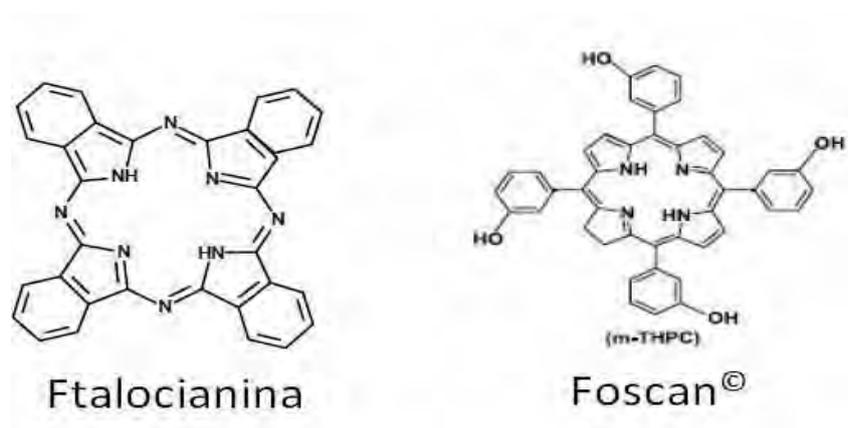


Figura 5- Fórmula estrutural da ftalocianina e Foscan[®]. Exemplos de fotossensibilizadores de segunda geração.

A hipericina (Hp) é uma substância que pode ser extraída de plantas que pertencem ao gênero *Hypericum perforatum* Linné, popularmente, esta planta pode ser conhecida por Erva de São João, Milfurada ou Jarsin. É uma planta muito comum na Europa e pode ser encontrada com facilidade na beira de estradas, valas e bosques. Os primeiros relatos de sua utilização datam do séc. V para o tratamento de febre e tosse. Mais adiante, já no século XVI, Gerard em 1597 relata que o chá extraído das flores e sementes da planta poderia ser utilizado para o tratamento de pedra na bexiga.

Com a crescente utilização desta planta, os pesquisadores da época desenvolveram através de um processo de destilação, um óleo que foi amplamente utilizado no tratamento de feridas infectadas e contusões em função das propriedades antiinflamatórias e bactericidas que tal óleo apresentava. A utilização deste óleo foi tão importante e eficaz na Europa, que após muitos anos de utilização com sucesso clínico comprovado, este foi incluído como

medicamento na primeira farmacopéia oficial de Londres sob o nome de Óleo Hypérici (1944).

Atualmente a Hipericina (Figura 6) é um medicamento classificado como fitoterápico e pode ser indicada no tratamento de distúrbios psicovegetativos que envolvam alterações de humor de níveis leve até moderado, no tratamento de distúrbios do sono, depressão, melancolia, dores musculares e no tratamento da cefaléia. A planta contém um grande número de metabólitos secundários, como por exemplo, os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os derivados antraquinônicos (iso-hipericina, proto-hipericina e pseudo-hipericina, p.ex.). Estes últimos compostos são os verdadeiros responsáveis pela ação farmacológica antidepressiva que o extrato obtido da planta apresenta^{15,20,86,89}.

Mais recentemente e em função da necessidade de promover um controle bacteriano de forma adequada e de maneira alternativa á utilização dos antimicrobianos tradicionais, a hipericina vem obtendo grande atenção por parte da comunidade científica por apresentar características antibacterianas e fototóxicas (Schey et. al.⁸⁶ 2000) que podem ser de interesse para a sua aplicação na terapia fotodinâmica.

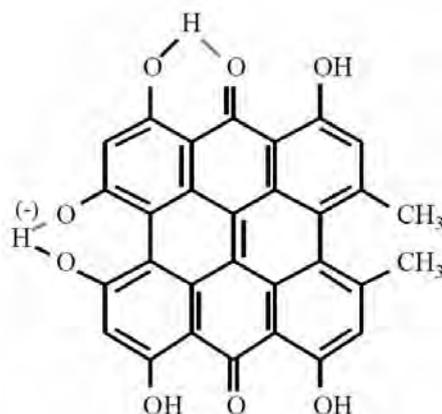


FIGURA 6 - Fórmula estrutural da hipericina.

A exemplo, de outras substâncias de origem vegetal que apresentam acentuadas características fotoquímicas, a curcumina vem sendo estudada de maneira que se possa determinar o potencial de ação desta como um fotossensibilizador viável para a terapia fotodinâmica. É um corante de origem natural que provém do rizoma (raiz) da *Curcuma Longa*, que apresenta cor amarelo ouro e há muito tempo é utilizada nas culturas orientais como corante e conservante para alimentos. Além disso, a curcumina é amplamente utilizada na medicina oriental como um medicamento alternativo para o tratamento de uma grande diversidade de doenças, bem como, para o tratamento de sinais e sintomas para condições como problemas pulmonares, problemas de pele, dores, feridas e desordens hepáticas.

A literatura acerca do uso da curcumina no cuidado à saúde humana é bastante ampla, para que se tenha uma idéia, através de uma pesquisa simples em qualquer uma das bases de dados disponíveis, é possível de ser encontrados cerca de 3000 trabalhos publicados que discutem os benefícios diversos que a curcumina promove nas mais diferentes áreas do conhecimento, entre elas podemos citar, a indústria de cosméticos, alimentícia, etc. Apesar de ser

amplamente comercializada, e consumida em países como, Estados Unidos, China, Turquia, Paquistão e Índia, muito ainda se discute com relação às propriedades biológicas, químicas e físicas da curcumina.

Alguns autores como Tonnesen et al.⁹⁵ em 1987, e Dahl et al.²² em 1989 descreveram que a curcumina, quando diluída em DMSO em concentrações que variam entre 5-10% seguida de exposição à luz em comprimentos de onda que variam de 300-500 nm, apresenta propriedades bactericidas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no entanto, os mecanismos pelo qual a curcumina exerce o seu efeito antibacteriano ainda não está estabelecido. Estes autores relatam ainda que este efeito foi dose dependente para o fármaco, bem como para parâmetros como tempo de exposição à luz, tempos de incubação pós-irradiação, tipo de bactéria e o tipo de preparo do fármaco.

A microbiota oral humana é extremamente rica e altamente diversificada, existem aproximadamente cerca de 400 espécies bacterianas além de protozoários, fungos e vírus⁵. Os primeiros trabalhos disponíveis na literatura que estudam os efeitos da terapia fotodinâmica em bactérias orais datam de 1992 e foram executados por Wilson et al.^{4,13,26,105}, onde estes testaram o potencial bactericida de vários agentes fotossensibilizadores e observaram que os melhores resultados foram obtidos com o Azul de Toluidina (TBO), o azul de metileno, o alumínio dissulfonado fitalocianino (AlPcS2), o cristal violeta e a dihematoporfirina éster (DHE). Neste mesmo estudo os pesquisadores observaram ainda que, nenhum dos fotossensibilizadores utilizados apresentaram efeitos significativos quando em ausência de luz o que corrobora os resultados obtidos por Policard em 1924⁸¹.

Em 1993 Burns et al.^{12,13} publicaram dois estudos sobre a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre bactérias cariogênicas, estes estudos foram realizados utilizando suspensões de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* presentes em dentina humana, e verificaram que, os microrganismos escolhidos eram sensíveis ao tratamento imposto e ainda que reduções de até 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) foram também observadas.

Neste contexto, surge a terapia fotodinâmica com aplicação antimicrobiana (TFDA), que pode ser considerada atualmente como um possível tratamento da lesão de cárie, uma vez que esta técnica apresenta alta seletividade, baixa toxicidade e ser de fácil aplicação. Diversos estudos demonstraram que a TFDA é efetiva contra grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas⁷⁰, estes estudos ainda evidenciaram a possibilidade da utilização de uma grande quantidade de fotossensibilizadores. No entanto existe pouca evidência científica que apóia o uso da TFDA para tratamento de lesões cariosas em dentina uma vez que, as bactérias presentes em tais lesões parecem ser menos suscetíveis a este tipo de tratamento devido à baixa penetração da droga na estrutura cristalina, bem como a dificuldade de propagação da luz através da dentina.

2 PROPOSIÇÃO

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os diferentes aspectos envolvidos no controle microbiológico de bactérias cariogênicas através da técnica de Terapia Fotodinâmica com a utilização de três drogas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Revisar a literatura disponível sobre o uso da terapia fotodinâmica, os seus mecanismos de ação, evolução, derivação, limitações e direções futuras na Odontologia.
2. Estudo da viabilidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando os fotossensibilizadores Curcumina, Hipericina e Hematoporfirina em células planctônicas de *Streptococcus mutans*.
3. Estudo da viabilidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando os fotossensibilizadores Curcumina, Hipericina e Hematoporfirina em biofilmes de *Streptococcus mutans*.

3 CAPÍTULO 1

Revisão sistemática da literatura sobre fotossensibilizadores utilizados para tratamento da cárie dental

Autores: Fernando Luis Esteban Florez, Vanderlei Salvador Bagnato, Osmir Batista de Oliveira Júnior.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica médica que, é largamente utilizada no tratamento de tumores em diferentes regiões do corpo devido a sua ação seletiva, minimamente invasiva, de alta efetividade e ainda apresenta baixos níveis de contra-indicações. Em alguns países industrializados como os Estados Unidos, a França e a Noruega, esta técnica possui aprovação para ser utilizada em lesões de cabeça e pescoço, de pulmão, lesões orais e principalmente para o tratamento dos diferentes tipos de câncer de pele. Seu mecanismo de ação está baseado na utilização de corantes específicos que quando submetidos a energia luminosa adequada, promovem a geração de radicais livres de oxigênio (oxigênio singlete e outros). Estes radicais apresentam alta reatividade, baixa seletividade, e são capazes de oxidar uma grande variedade de moléculas orgânicas destruindo as células neoplásicas marcadas pelo fotossensibilizador.

O mesmo princípio de ação pode ser utilizado para tratar doenças de origem microbiana. Esta aplicação, denominada de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) apresenta vantagens significativas em relação aos antibióticos. A TFDA age de forma eficaz contra bactérias (Gram positivo e Gram negativo), vírus e fungos (Wilson et al.¹⁰⁵). Além disso, Hamblin e Hasan⁵¹ em 2004 sugerem que seja improvável o

surgimento de cepas bacterianas resistentes frente ao tratamento fotodinâmico. Esta improbabilidade do desenvolvimento de resistência esta associada com a grande citotoxicidade que os radicais livres de oxigênio liberados durante o processo apresentam.

Como a cárie é uma doença bacteriana específica (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp* e *Actinomicis viscosus*), a periodontite (*Porfiromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteriódes forsitus*, *Actinobacillus actinomicetencomitans*) fica claro que a TFDA pode representar uma alternativa viável no controle dos microorganismos presentes cavidade oral. Trabalhos publicados na literatura demonstram que alguns fotossensibilizadores como o azul de metileno^{88,93}, o azul de toluidina^{8,17,45} e o rosa bengal⁷⁷ foram capazes de promover reduções bacterianas significativas em microrganismo cariogênicos e periodontopatogênicos, quando estes se encontram em suspensões planctônicas, mas poucos são os trabalhos que investigam o potencial destes fotossensibilizadores em biofilmes maduros organizados.

Wainwright e Crossley⁹⁷ destacam que pouco se conhece sobre as características e propriedades dos fotossensibilizadores utilizados no controle microbiológico em odontologia. Estes autores ainda sugerem que esta baixa eficiência pode estar relacionada principalmente, com alguns fatores que estão diretamente relacionados com os fotossensibilizadores, como por exemplo: i) a penetrabilidade do fotossensibilizador na estrutura do biofilme, ii) a solubilidade do FS em meio aquoso, iii) a taxa metabólica dos microrganismo dentro de cada uma das camadas do biofilme, iv) efeito das cargas positivas e negativas no comportamento, e sitio de ação dos fotossensibilizadores, e v) o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. Em associação a estes fatores a literatura claramente demonstra que não existe consenso em relação aos protocolos de utilização da terapia fotodinâmica, fontes de luz, comprimentos de onda, tipo e

concentração dos fármacos e padronização dos estudos realizados. Estes fatores em associação dificultam em muito a possibilidade de comparação entre os diversos resultados encontrados.

Se considerarmos os diferentes aspectos da cárie dental: a forma de transmissão da microbiota cariogênica por bactérias salivares, o mecanismo de infecção da superfície dental via biofilme bacteriano, os aspectos odontológicos dessa microbiota aderida que determinam a cariogenicidade e a virulência da placa bacteriana cariogênica, entre outros, fica evidente que existem várias opções e desafios a serem superados para a indicação da TFDA como terapia para o tratamento da cárie dental.

Um destes desafios refere-se a quais fotossensibilizadores são mais adequados para estas aplicações.

PROPOSIÇÃO

Através de revisão crítica da literatura, realizar análise comparativa de efeito inibitório de diferentes agentes fotossensibilizadores sobre *Streptococcus mutans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um levantamento a partir de bancos de dados *on line* (PubMed e Bireme). As palavras-chave utilizadas foram: terapia fotodinâmica antimicrobiana, mecanismos de ação, cárie dental, curcumina, hipericina, photogem, azul de metileno, azul de toluidina, rosa de bengala, *Streptococcus mutans*, LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e LED (Light-emitting Diode) nos idiomas: português e inglês. Realizou-se o fichamento dos trabalhos e a tabulação dos dados de maneira a observar os principais microrganismos cariogênicos, fotossensibilizadores utilizados e fontes de luz e faixas espectrais.

Esta estratégia de busca resultou em: terapia fotodinâmica antimicrobiana AND cárie dental (2 artigos); terapia fotodinâmica antimicrobiana AND curcumina OR Hipericina OR photogem (15 artigos); cárie dental AND curcumina OR, hipericina OR photogem OR azul de metileno OR azul de toluidina OR rosa bengal (31 artigos).

Estes artigos foram revistos criticamente a fim de comparar o efeito inibitório da TFDA para *Streptococcus mutans* relatado por cada autor, o tipo e dose de energia empregada e o método de análise utilizado.

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) surgiu no início do século XX com a primeira descrição da utilização de corantes combinados com luz para controlar microrganismo (MO), onde Oscar Raab, um médico alemão que estudava o potencial citotóxico de uma série de corantes, observou que baixas concentrações de acridina promoviam a morte de *Paramecium caudatum* quando expostos á luz do dia⁶⁹.

Alguns anos mais tarde, em 1928⁸⁰, surgem as primeiras substâncias bactericidas. Estas ficaram conhecidas como antibióticos, e as principais drogas que representam esta época são as penicilinas, as estreptomicinas e as tetraciclina. Os ótimos resultados obtidos com a utilização destas promoveram a significativa melhora na qualidade e expectativa de vida das pessoas, além disso, doenças que eram consideradas até então como incuráveis foram totalmente erradicadas.

O grande sucesso das terapias antibióticas acabou inviabilizando quase que por completo o desenvolvimento da TFDA, e somente mais recentemente, e à partir do surgimento de cepas microbianas resistentes, aos agentes antibióticos, é que novas abordagens de tratamento voltam a ser objeto de ampla investigação.

Atualmente a TFDA tem sido considerada como uma importante alternativa no controle microbiológico de infecções localizadas⁸¹, de origem bacteriana, na pele e na cavidade oral, uma vez que, esta terapia é eficaz para o tratamento de uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além disso, diversos trabalhos^{88,91,106,107,109,110} demonstram que a TFDA ainda pode ser utilizada com sucesso no controle de fungos, vírus e protozoários.

Os primeiros relatos da utilização da TFDA na odontologia datam do início da década de 1990, onde Wilson e colaboradores^{27,45, 104,105,107-109} testaram em MO como os *Streptococcus sanguis*, as *Porphyromonas gingivalis* e os *Acetinobacillus actinomycetenncomitans*, uma série de fotossensibilizadores (FS) que foram irradiados em regimes de baixa intensidade de potência, com faixa espectral de 660 nm \pm 5. Os resultados obtidos com este experimento demonstraram que os FS azul de toluidina, azul de metileno e clorina B apresentaram os melhores resultados de inativação microbiana.

Tabela 1. Relatos da utilização da TFDA em MO Gram positivos e Gram negativos.

ESPÉCIES (Gram + ou Gram -)	FOTOSENSIBILIZADORES	AUTORES	ANO DE PUBLICAÇÃO
Escherichia coli (-)	N-Alkylpyridylporphyrins	Benov et al. ⁶	2002
Acinetobacter baumannii (-), E. coli (-)	Porfirina cationica hidrofílica	Nitzan and Ashkenazi. ⁷³	2001
S. aureus (+), Staphylococcus epidermidis (+), Streptococcus pyogenes (+)	Azul de metileno	Zeina et al. ⁹³	2001
S. aureus, S. epidermidis, Pseudomonas aeruginosa (-), E. coli, Proteus mirabilis (-)	Photosens	Tolstykh et al. ⁷²	2001
S. aureus, Streptococcus pneumoniae (+), Enterococcus faecalis (+), Haemophilus influenzae (-), E. coli, P. aeruginosa	Azul de metileno, Azul de Toluidina	Usacheva et al. ⁸⁸	2001
E. coli, Enterococcus hirae (+)	Zn(II) ftalocianina tetrasulfonada	Gabor et al. ⁴⁴	2001
S. aureus (+)	Hematoporfirina (Hp)	Bertoloni et al. ⁷	2000

A partir dos relatos de sucesso obtidos com os trabalhos anteriores, uma grande quantidade de estudos laboratoriais foi realizada^{14,15,19} utilizando bactérias cariogênicas^{14,15,29} e periodontopatogênicas^{23,24,31,88,89}, em culturas planctônicas e em biofilmes, de modo a investigar os efeitos bactericidas que poderiam ser alcançados com alguns tipos de FS, como o azul de toluidina e o azul de metileno, e os resultados obtidos nestes estudos, claramente demonstraram que os FS utilizados foram efetivos para os MO *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Acetivobacillus actinomycetenumcomitans*, *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces viscosus*.

Wood e colaboradores em 1999¹¹⁰ realizaram um estudo sobre os efeitos da TFDA utilizando um FS de segunda geração, a Zn(II)-ftalocianina com características catiônicas em biofilmes dentais por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores relataram que o método físico utilizado na avaliação, demonstrou que, após o tratamento, os biofilmes tinham as suas características morfológicas normais bastante alteradas, estes eram mais finos em espessura e menos densos em população, além disso, os autores observaram grandes reduções na agregação entre os MO, e na agregação entre os MO e a matriz polimérica extracelular (MPE).

Alguns autores como Wainwright em 2002⁹⁶ e Tuite e Kelly em 2003⁸⁷, publicaram trabalhos que descrevem os diferentes sítios de ação da TFDA. Em um destes trabalhos⁹⁷, o autor relata que a MPE que é depositada pelos MO, e que atualmente, é considerada como um fator de resistência dos MO frente aos agentes agressores externos, sofreu danos significativos em sua estrutura e em sua organização após o uso da TFDA, o que sugere que a MPE também seja susceptível ao efeito fotodinâmico.

Este estudo foi realizado utilizando como FS o azul de metileno em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, e ao final do trabalho, o autor conclui que a TFDA apresenta um efeito dual sem precedentes na história do controle microbiológico⁹¹, ou seja, além de bactericida, esta terapia ainda apresenta a capacidade de destruir o biofilme, o que é considerado como uma grande vantagem em comparação com os antibióticos atualmente disponíveis.

Em 2004 Wainwright e Crossley⁹⁷ publicaram uma revisão de literatura, onde os autores discutiram a possibilidade de ocorrência do desenvolvimento de resistência bacteriana frente á utilização repetitiva dos FS utilizados na TFDA, e ao final desta revisão, os autores concluíram que este tipo de utilização não foi capaz de induzir o surgimento de cepas bacterianas resistentes ao tratamento.

Os autores ainda discutem que apesar de as bactérias apresentarem uma série de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase⁵⁹, peroxidase⁵⁹ e a catalase⁵⁹ que as protegem das agressões de alguns radicais livres, estas não conseguem impedir o processo oxidativo imposto pelo oxigênio singlete (¹O₂), além disso, os autores acreditam que seja inviável o surgimento de cepas resistentes ao tratamento, uma vez que, a terapia independe de uma via metabólica alvo.

Tabela 2. Relatos da utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em Streptococcus.

Autor	Ano	Micro-organismos	Fontes de luz	λ (nm)	Potência (mW)	Fotosensibilizador	Redução Microbiana (%)
Bevilacqua ⁸	2007	S. mutans	LED	640	116	Azul de toluidina	100
Burns ¹⁷	1995	S. mutans	Laser	632,8 660	7,3 11	Azul de toluidina	NC
Gonçalves ⁴⁵	2009	S. mutans	Laser	660	40	Azul de metileno Azul de toluidina	73 70
Metcalf ⁶⁷	2006	S. mutans	Luz Branca (filamento de tungstênio)	500-550	400x 10 ³	Azul de toluidina	98
O'Neill ⁷⁴	2002	S. mutans	Laser	632,8	60	Azul de toluidina	97,5
Paulino ⁷⁷	2005	S. mutans	Luz Halógena	400-500	12,8	Rosa Bengal	100
Zanin ⁹¹	2005	S. mutans	Laser LED	632,8 640	32 (ambos)	Azul de toluidina	99,9 (ambos)
Zanin ⁹²	2006	S. mutans S.sobrinus S.sanguinis	LED	640	32	Azul de toluidina	95-99
Williams ⁹⁸	2004	S.mutans	Laser	633	60 80	Azul de toluidina	NC

Outros trabalhos^{3-5,15,43,61,76} relatam que a falta de especificidade que os agentes FS apresentam, e dependendo da carga destes (neutro, catiônico ou aniônico), os FS podem atuar de diferentes formas nos MO, ou seja, os FS neutros ou aniônicos conseguem penetrar no interior das células bacterianas e degradam estruturas fundamentais para vitalidade bacteriana⁶⁴, como por exemplo, o ácido nucléico, o que leva á inativação do MO. Já os FS aniônicos se ligam de forma eficiente em alguns receptores presentes na parede celular de células Gram-negativas e não apresentam reatividade suficiente para inativa-las⁶⁷.

O mecanismo de ação da TFDA esta baseado na liberação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é um radical livre extremamente reativo, muito instável, que apresenta tempo de vida extremamente curto e pequena capacidade de difusão, e em função destas características, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que é gerado durante o processo de irradiação, pode reagir com as biomoléculas circunvizinhas, ou pode decair ao seu estado fundamental de energia em um espaço de tempo muito curto (da ordem de $0,04\mu\text{s}$).

Esta grande reatividade apresentada pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) tem sido considerada como o principal fator relacionado com a destruição da MPE⁶⁰, em adição, acredita-se que esta característica possa contribuir para a inibição da troca plasmídica⁵¹ que ocorre entre os MO, o que dificulta a transmissão de fatores de resistência relacionados com a terapia, além disso, alguns trabalhos^{24,48} sugerem que TFDA pode contribuir para evitar o processo de re-colonização das superfícies dentais.

Em função dos mecanismos de ação da TFDA e dos trabalhos científicos publicados na área, que relatam o sucesso desta no controle de diversos MO em fase planctônica e em fase de biofilme, esta terapia vem nos dias de hoje, sendo considerada como uma técnica coadjuvante viável para ser utilizada no controle da instalação do

processo cariioso, bem como, no tratamento minimamente invasivo da doença cárie. A literatura ainda recomenda que novos trabalhos sejam realizados de maneira a obter protocolos de tratamento que possam ser utilizados de maneira segura na rotina clínica diária.

MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é, nos dias de hoje, uma técnica que apresenta grande aceitação por parte das comunidades científica e clínica internacionais, e basicamente esta opera por meio da utilização de corantes não tóxicos que, quando associados a comprimentos de onda visíveis, em regimes de baixa intensidade de potência, promove a liberação de uma série de radicais livres que apresentam a capacidade de oxidar diferentes moléculas orgânicas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos da terapia fotodinâmica em nível celular.

SÍTIO DE AÇÃO		AÇÃO	RESULTADO
Água		Adição/Subtração de íons Hidrogênio	Formação de hidroxilas reativas
Parede celular: lipídios insaturados		Peroxidação	Peroxidação
Cobertura Proteica		Oxidação	Degradação proteica
Envelope viral proteico		Subtração de íons Hidrogênio	interligação das bases peptídicas
Resíduos de ácidos nucleicos		Oxidação das bases	Formação de 8-hidroxi-guanosina
Enzimas		Oxidação	
CONSEQUÊNCIA	EVENTO ANTIMICROBIANO		
Formação de peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroperóxidos	Processos oxidativos avançados		
Formação de hidroperóxidos	Aumento da permeabilidade de íons em nível de membrana celular		
	Perda da capacidade patogênica		
	Perda da capacidade de reparação/ Morte		
Inativação enzimática	Substituição da base/ Quebra da fita/		
Degradação dos nucleotídeos/	Mutações/ Inibição da divisão celular		
Degradação de açúcares/ Quebra	Perda de patogenicidade/ Inibição da		
Inibição das funções dos ribossomos	divisão celular.		

Diversos trabalhos na literatura descrevem que os FS não devem apresentar quaisquer efeitos citotóxicos quando em ausência de luz^{42,36-39,79}, e isto ocorre porque, nesta condição, as moléculas do FS se encontram em seu estado energético fundamental (S_0). No momento em que a luz, em comprimento de onda específico é introduzida no sistema, a energia contida nos fótons é transferida para as moléculas do FS, e isto faz com que estas moléculas fiquem excitadas.

Quando excitadas as moléculas do FS são altamente reativas, bastante instáveis e tendem a decair novamente para o seu estado de menor energia (S_0), este decaimento energético ocorre de maneira espontânea por meio da liberação da energia absorvida através da emissão de luz por fluorescência, que é um fenômeno físico que apresenta tempo de vida bastante curto e seu comprimento de onda é sempre maior do que o comprimento de onda utilizado na excitação. Outra possibilidade passível de ocorrer é a liberação da energia adquirida por meio da geração de calor, este fenômeno físico é conhecido como conversão interna e pode ser observado através do aumento da temperatura do sistema.

Uma terceira possibilidade de decaimento ainda pode ocorrer com as moléculas localizadas no estado (S_1), nesta situação, parte da energia adquirida durante a excitação do FS, é utilizada para promover a travessia intersistema, com isso, a molécula que ora se encontrava em um estado de maior energia (S_1) passa agora para um estado intermediário de energia (T_1) que demanda da alteração da orientação dos spins da última camada de valência das moléculas do FS.

Uma vez que as moléculas do FS se encontrem neste estado energético intermediário (T_1), elas podem decair de maneira espontânea para o seu estado

fundamental de energia (S_0) através da emissão de luz por fosforescência, ou podem interagir com as moléculas vizinhas de duas maneiras diferentes.

A primeira interação possível de ocorrer entre as moléculas excitadas do FS (T_1) com as biomoléculas da vizinhança, é conhecida como reação do Tipo I, e ocorre através da troca de elétrons ou íons hidrogênio entre o FS e as biomoléculas, dando origem a formação de radicais livres como o peróxido de hidrogênio, as hidroxilas reativas e os superóxidos. A segunda possível interação ficou conhecida como reação do Tipo II, este caminho de reação é decorrente da interação do FS excitado (T_1) com o oxigênio tecidual (3O_2) dando origem ao oxigênio singleto (1O_2), que é um radical extremamente reativo e que tem capacidade de oxidar uma série de diferentes compostos orgânicos.

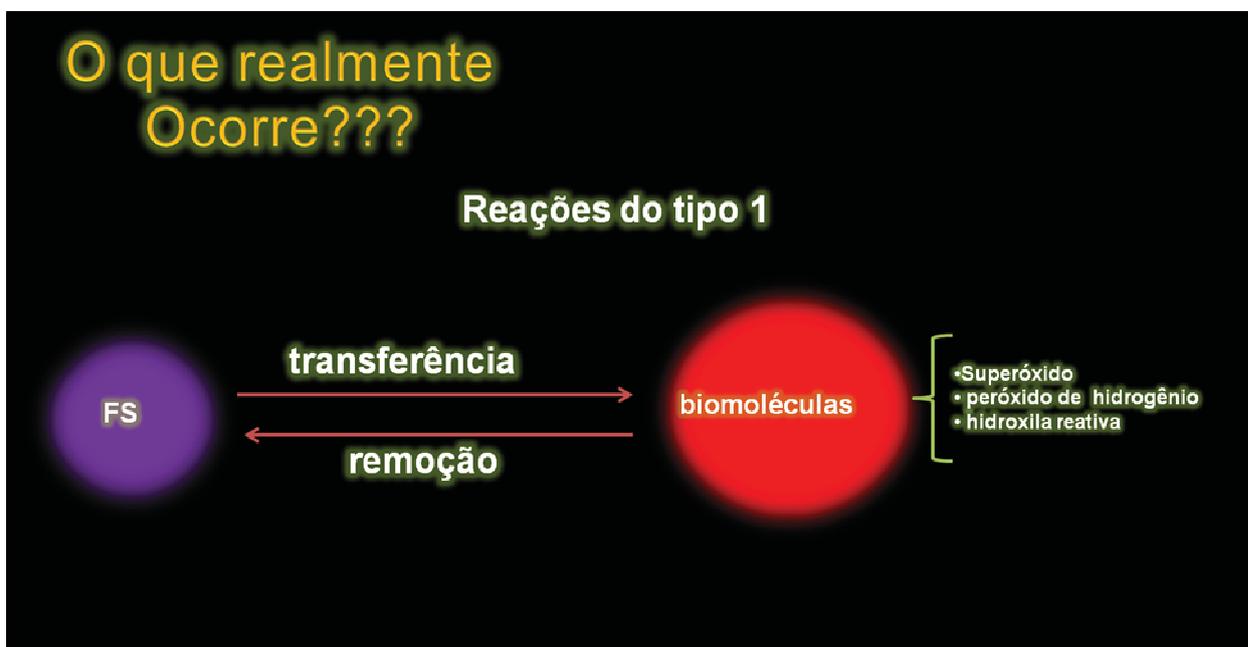


FIGURA 1. Desenho esquemático que representa a formação de moléculas reativas. Reações do tipo 1.

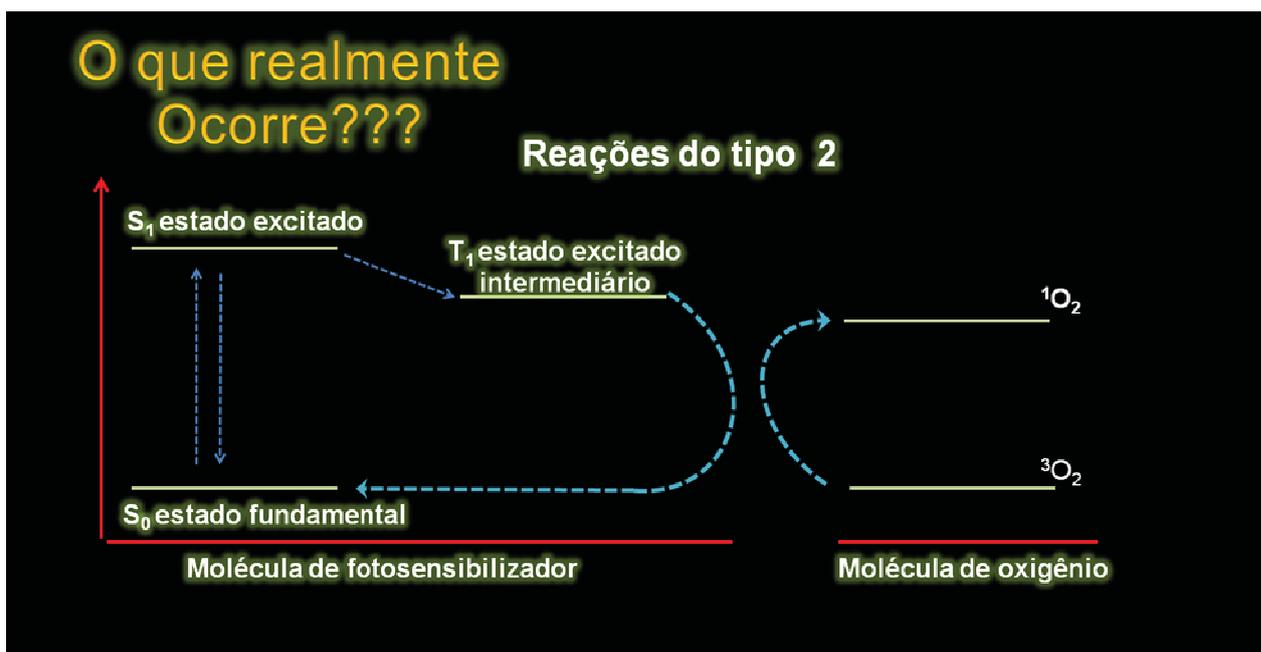


FIGURA 2. Desenho esquemático que representa o processo de geração do oxigênio singlete. Reações do tipo 2.

A TFD é uma técnica capaz de promover a oxidação do tecido cancerígeno de forma inespecífica, ou seja, o sucesso desta técnica não depende da presença de uma via metabólica alvo⁷⁹, além disso, uma série de trabalhos publicados na literatura^{30,34,71,83} relatam que, apesar desta inespecificidade observada em nível celular, os FS utilizados apresentam certo grau de afinidade com o tecido tumoral.

Boyle e Dolphin em 1996¹¹ publicaram uma revisão de literatura que estudou a relação entre a estrutura química dos FS, com a localização destes em nível celular, e ao final deste estudo, os autores puderam concluir que, as diferentes estruturas químicas influenciam de maneira significativa a interação dos FS com as células tumorais. Os autores descrevem ainda que, os FS que apresentam características catiônicas conseguem penetrar na célula tumoral e tendem a se localizar preferencialmente no núcleo e nas mitocôndrias das células.

Ainda neste trabalho, foi estudada a relação entre a solubilidade e a localização dos FS, e o levantamento realizado sugere que, as drogas lipossolúveis se ligam em estruturas encontradas na membrana celular, enquanto que, a exemplo das drogas catiônicas, os FS hidrossolúveis penetram no interior das células e são encontrados no interior dos lisossomos. Outros trabalhos descrevem que o sucesso da TFD esta relacionado diretamente com a localização dos FS na célula, uma vez que, além de apresentar um tempo de vida extremamente curto (da ordem de $0,05\mu\text{s}$), o oxigênio singlete que é gerado nas reações do tipo II, consegue difundir menos do que $0,02\mu\text{m}$ do sítio onde este foi gerado.

Clinicamente pode ser observado que os tecidos submetidos ao tratamento com a TFD apresentam sinais característicos de necrose. Alguns trabalhos na literatura sugerem que, esta necrose pode estar diretamente relacionada com a ocorrência de danos vasculares no sistema de irrigação do tecido tumoral^{21,34,55,71}. Nesta condição de isquemia tecidual, as células tumorais, que apresentam alto metabolismo celular, não conseguem manter a sua vitalidade e morrem. Este processo de morte celular ficou conhecido como apoptose, e os primeiros relatos científicos acerca deste processo, foram obtidos a partir dos trabalhos in vitro realizados por Kerr e colaboradores em 1972⁵⁸. Os autores descreveram que a apoptose é um mecanismo na qual os organismos iniciam, de forma programa, a morte celular através de um processo genético normal que leva a fragmentação do núcleo celular e conseqüente dissociação da célula.

Neste processo, as células circunvizinhas absorvem o resultado desta dissociação o que minimiza a liberação de produtos inflamatórios como, por exemplo, as enzimas lisossomais. Apenas em 1991 é que foi relatada a primeira resposta apoptótica da TFD in vivo¹. A descoberta de que a TFD pode gerar respostas apoptóticas em células

cancerígenas forneceu aos pesquisadores uma adequada justificativa para o mecanismo de ação da TFD, o que promoveu a sua implementação clínica em todo o mundo.

FONTES DE LUZ UTILIZADAS NA TFD/ TFDA

O sucesso das terapias aqui discutidas depende de fatores como a localização do tecido alvo, o FS escolhido (tipo e concentração), o comprimento de onda, a dose de energia e o sistema de entrega de luz. Em função da importância destes fatores, nesta sessão do trabalho, serão apresentadas e discutidas as diferentes fontes de luz que podem ser utilizadas tanto na TFD quanto na TFDA.

Desde o surgimento da TFD no início do século XX^{53,49,51,91} até os dias atuais, diferentes fontes de luz foram testadas e utilizadas para promover a obtenção do efeito fotodinâmico. O primeiro sistema de entrega de luz era baseado na tecnologia do arco de carbono que emitia luz com grande amplitude espectral e baixa intensidade de potência. Mais recentemente, já na década de 1960^{13,42}, foram testados os primeiros sistemas de entrega de luz baseados na tecnologia da amplificação da luz por meio da emissão estimulada de radiações (LASERs), estes sistemas apresentavam características muito interessantes para serem utilizados na TFD, como por exemplo, a entrega de grandes quantidades de energia, a focalização da área de iluminação, o comprimento de onda coerente e monocromático.

Os principais sistemas de LASER dessa época foram os sistemas gasosos como os LASERs de Argônio (488nm/ 514,5nm - Ar) e Hélio-Neônio (632,8nm -HeNe)¹², e apesar do alto custo de manutenção que estes sistemas apresentam, da necessidade de alinhamento recorrente dos espelhos presentes nos sistemas, e da falta de portabilidade, estes eram na época, considerados como a solução de primeira escolha, uma vez que, a

estes sistemas podiam ser acopladas fibras ópticas que permitiam a irradiação dos mais diferentes tipos e localização de tumores.

COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	
LASERS	
ARGÔNIO	488-514
CORANTE BOMBEADO POR ARGÔNIO	585 OU 630
CORANTE AJUSTÁVEL	400-1000
LÂMPADAS DE COMPRIMENTO DE ONDA FILTRADO	
LÂMPADAS HALÓGENAS DE QUARTZO	620-640
FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO	>600
ARCO DE XENÔNIO	600-700
COBERTURA DE TODO ESPECTRO VISÍVEL	
LEDS	

Tabela 4. Fontes de luz utilizadas na TFD.

Outra vantagem dos sistemas de Ar é que estes poderiam ser utilizados para bombear sistemas de LASER de corante¹², e dessa maneira emitir luz em diferentes comprimentos de onda que se fizessem necessários para cada um dos tipos de FS disponíveis. Os LASERs de corante são os sistemas mais comumente utilizados na TFD, porque estes podem utilizar compostos químicos como a Rodamina B, a Rodamina 101 e a Sulfo-rodamina, que são substâncias capazes de absorver intensamente as duas principais linhas de emissão do LASER de Ar (488nm e 514,5nm) e promovem o deslocamento da emissão deste sistema para comprimentos de onda na região entre 600 até 650nm, que são comprimentos de onda mais favoráveis para serem utilizados com os FS de primeira geração, como as porfirinas (Hp) e os derivados de hematoporfirinas (HpD).

Os sistemas de corante, também são sistemas que geram altos custos de implementação e utilização na rotina clínica diária, uma vez que, estes necessitam de manutenções regulares que devem ser realizadas por pessoal técnico especializado, além

disso, estes sistemas ainda consomem grandes quantidades de energia elétrica e os corantes utilizados apresentam vida útil limitada.

Diversos trabalhos na literatura^{13,26,56,57} relatam a utilização dos sistemas de LASER de corante acoplados com fibras ópticas para o tratamento do câncer de pulmão, lesões orais pré-cancerizáveis, câncer de esôfago, câncer de bexiga e câncer de pele. Estes trabalhos ainda relatam que a maior vantagem observada com a utilização destes sistemas é que o comprimento de onda emitido apresenta maior capacidade de penetração nos tecidos humanos quando comparados aos sistemas de LASER de Ar.

Á seguir surgiram os sistemas LASER de corante que operam no regime pulsado (PW)⁶⁹, estes apresentam largura de pulso de 10 até 50ns¹² e frequências de repetição de pulso da ordem de 1KHz¹², estes sistemas, dependendo do tipo de vapor de metal utilizado como corante (p.ex. cádmio, selênio ou ouro), podem apresentar comprimentos de onda na região visível¹² e na região ultravioleta (UV)¹² do espectro eletromagnético. Estes sistemas ficaram conhecidos como LASERs do tipo iônico e apresentam como vantagens, a entrega de grandes quantidades de luz, o fácil acoplamento de fibras ópticas e a grande secção transversal do feixe emitido (1- 3cm² – valores típicos).

Em 1964 surgem os primeiros sistemas de LASERs de estado sólido, neste mesmo ano, Keyes e Quist⁵⁷ demonstraram com sucesso a utilização deste sistema em temperatura de 4K, mas os progressos iniciais alcançados tiveram os seus esforços reduzidos ou praticamente paralisados, porque, além da baixa quantidade de luz emitida, estes LASERs necessitavam de um potente sistema de resfriamento criogênico. Em 1972, uma década após o surgimento dos LASERs de estado sólido, Danielmeyer e Ostermayer²⁵ demonstraram a utilização destes sistemas em temperatura ambiente.

Mais recentemente em 1982 Zhou e colaboradores⁹⁴ apresentaram um sistema de LASER de estado sólido que utilizava um cristal de neodímio dopado com ítrio, alumínio e gálio (Nd:YAG) como substrato, este sistema tinha dimensões bastante reduzidas e apresentava grandes vantagens com relação aos sistemas anteriores, como por exemplo, a longa durabilidade, a robustez e a óptica focal extremamente simples. Estes podem ser utilizados na TFD de maneira similar àquelas descritas para os sistemas de Ar e de corante, ou seja, a luz pode ser entregue de forma direta ou através da utilização de uma fibra óptica que entrega a luz na região de interesse.

Estes sistemas de LASER normalmente emitem luz em uma linha principal localizada na região do infravermelho próximo¹² (Nd: YAG - 1064nm), são pulsados e apresentam frequências maiores (da ordem de MHz) do que os sistemas de LASER do estado gasoso ou àquelas observadas nos LASERs de corante. Estas características associadas a uma largura de pulso menor (da ordem de nanosegundos) conferem a estes sistemas, energia de pico e irradiância bastante elevadas. Outra vantagem é que estes sistemas podem ter a sua frequência dobrada¹², e com isso, outros comprimentos de onda podem ser obtidos, como por exemplo, comprimentos de onda na região do visível (532nm) e do ultravioleta (266nm).

Mais recentemente surgiram os LASERs de semicondutores, que apesar de serem LASERs de estado sólido, a literatura os classifica como sendo uma classe diferente, e se refere a estes sistemas como LASERs de diodo, estes podem operar tanto no modo pulsado¹² (Pulsed Wave – da ordem de picosegundo e milissegundo), quanto no modo contínuo (Continuous Wave), apresentam largura de pulso de 6nm, são resfriados a ar, entregam grandes quantidades de energia, são extremamente versáteis, e por estas características estes sistemas têm sido considerados como um grande avanço na popularização da utilização clínica da TFD.

Além disso, estes sistemas permitem que sejam realizadas montagens utilizando diversos diodos, que podem ser arrançados em diferentes geometrias permitindo a entrega de luz em grandes quantidades e de maneira extremamente eficiente. Diversos trabalhos^{37,50,62} relatam a utilização dos sistemas de LASER de diodo no tratamento de uma série de lesões presentes na pele, na cavidade bucal, e também existem relatos de sucesso no tratamento da degeneração macular e de adenomas da glândula pituitária.

Apesar do grande sucesso da utilização dos diferentes sistemas de LASER na TFD, os LASERs não são as únicas fontes de luz disponíveis, e por este motivo, vários pesquisadores investigam outras fontes de luz, como por exemplo, as lâmpadas e mais recentemente, os equipamentos baseados na tecnologia dos diodos emissores de luz (LED)^{20,36}. De maneira geral, os sistemas que utilizam as lâmpadas como fontes emissoras de luz⁸⁶, apresentam algumas características que podem ser consideradas como vantajosas quando em comparação aos sistemas de LASER tradicionais, entre elas podem ser citadas, o baixo custo operacional de manutenção, a portabilidade e a robustez destes equipamentos, a interface amigável ao usuário e a possibilidade de irradiação de grandes superfícies teciduais.

Os principais tipos de lâmpadas são as lâmpadas alógenas⁵⁴, as lâmpadas de arco de xênon¹², as lâmpadas de vapor metálico¹², as lâmpadas de vapor de sódio¹² e as lâmpadas fluorescentes¹². Em comparação aos LASERs, as lâmpadas emitem luz em uma ampla faixa espectral, ou seja, a irradiância total esta distribuída ao longo de toda a faixa que é emitida, o que significa que, quando utilizados na TFD, grande parte da energia emitida esta sendo desperdiçada, uma vez que, os FS de maneira geral apresentam bandas de absorção bastante definidas.

De maneira a melhorar a eficiência dos sistemas baseados nas lâmpadas, estes passaram a utilizar uma combinação de filtros que selecionam a emissão da luz em uma faixa estreita de apenas 10nm. Tradicionalmente são utilizados filtros passa-alto e filtros passa-baixo que barram totalmente a emissão de radiações UV de alta potência, que são extremamente danosas aos seres humanos, e do infravermelho, que além de provocar danos térmicos nos tecidos irradiados, este comprimento de onda pode ainda prejudicar a óptica utilizada nestes sistemas.

Os diodos emissores de luz (LED) são fontes de estado sólido baseadas na tecnologia dos diodos semicondutores, e apesar do fato de estas não emitirem comprimentos de onda coerentes e monocromáticos, os LEDs, também são considerados como fontes de luz direcionais, uma vez que, o maior fluxo de emissão de luz se encontra orientado perpendicularmente em relação ao plano do diodo. Os LEDs emitem luz em uma faixa estreita do espectro eletromagnético, e os valores típicos da largura espectral de um LED variam de 6 a 10nm.

Em 2002, Moseley e Brancalion¹² publicaram uma revisão de literatura, na qual os autores discutem os principais fatores relacionados com a TFD, neste trabalho, os autores discorrem extensivamente sobre as características das diferentes fontes de luz que podem ser utilizadas na TFD, além disso, os autores ainda relatam que, a maior dificuldade na popularização da utilização dos LEDs na TFD, esta associada com a baixa potência emitida (da ordem de mW/cm²), o que nos dias atuais, isto não pode mais ser considerado como um fator limitante, uma vez que, existe no mercado uma série de LEDs de alto brilho que são capazes de entregar grandes quantidades de luz (da ordem de W/cm²).

Os LEDs apresentam uma série de vantagens⁶ quando comparados aos sistemas anteriormente discutidos, entre elas podem ser citadas as dimensões extremamente reduzidas, o baixo consumo energético e a não emissão de calor associado ao comprimento de onda de pico, além disso, são componentes versáteis e muito leves, que apresentam baixos custos de produção e de manutenção.

Os LEDs são robustos, apresentam vida média de aproximadamente 50.000 horas e podem ser arrançados em diferentes geometrias o que confere aos sistemas baseados nesta tecnologia a possibilidade de irradiar grandes áreas teciduais⁴⁷. Outra grande vantagem dos LEDs é que estes podem ser produzidos facilmente em diferentes comprimentos de onda, que vão desde a região do UVC (254nm) até a região do infravermelho próximo (1100nm)^{36,86}.

A análise da literatura relacionada com a utilização das mais diferentes fontes de luz na TFD, não permite concluir que algum tipo de sistema de irradiação seja superior na obtenção de melhores resultados com a TFD quando comparado aos demais.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

A terapia fotodinâmica tem sido considerada como uma alternativa viável para o tratamento dos mais diferentes tipos de câncer e de outras moléstias que afetam a saúde humana, como por exemplo, a psoríase, o lúpus e infecções localizadas de origem bacteriana, fúngica ou viral¹²⁶.

Atualmente a TFD é uma técnica aprovada e amplamente utilizada em uma série de países industrializados, como os Estados Unidos, a França, o Canadá e a Noruega¹⁵, e nestes países, a comunidade médica que têm feito uso desta técnica relata que, em alguns casos, foram obtidos resultados de erradicação total dos tumores tratados, além disso, o acompanhamento pós-operatório dos pacientes submetidos á TFD tem

demonstrado índices de recidiva próximos à zero. Em outros casos mais severos, estes médicos ainda relatam que, onde existam lesões tumorais disseminadas em grandes áreas do corpo, a TFD não é capaz de curar o paciente, mas esta pode ser utilizada como um agente de ação paliativa, o que pode melhorar o estado geral do paciente e conseqüentemente pode promover a obtenção de uma qualidade de vida melhor.

Além do tamanho e da localização do tumor, a entrega da droga no tecido alvo também é considerada como uma grande limitação desta técnica. Esta limitação é decorrente das próprias características químicas dos fotossensibilizadores (FS) utilizados na TFD, que são substâncias que apresentam uma série de ligações duplas conjugadas e grandes anéis aromáticos, que conferem a estas moléculas grande capacidade de absorver a luz e um comportamento hidrofóbico que prejudica a absorção destas drogas no interior das células tumorais.

Tabela 5. Vantagens da terapia fotodinâmica.

VANTAGENS
Plataforma tecnológica apresenta grande potencial de aplicação
Técnica minimamente invasiva
Baixa toxicidade sistêmica
Multiplos mecanismos de ação
Pode ser aplicada de forma repetida sem a indução de resistência significativa ou hipersnsibilidade
Rápido efeito em tratamento único
Esta terapia pode ser curativa, paliativa ou estabilizar a progressão da doença
Efetiva contra uma grande variedade de micro-organismos, incluindo cepas antibiótico resistentes
Aplicação tópica sem indução de toxicidade sistêmica ou resistência á droga

Tabela 6. Limitações da terapia fotodinâmica.

LIMITAÇÕES	
FUNDAMENTAL	TECNOLOGIA
Penetração da luz é muito limitada nos tecidos	Ausência de sistemas de uso geral
Normalmente não pode ser aplicada á condições sistemicas	Uso limitado, dosimetria utilizada é depende de cada tipo de paciente
Otimização do processo extremamente complexa	
Dependente do oxigênio tecidual tratamento adequado é desafiador em grandes lesões	especificidade limitada dos
	custo das fontes de luz
Desconhecido	entrega da droga por longos períodos

Outra limitação importante da TFD e de difícil manejo aos pesquisadores esta relacionada com a quantidade de oxigênio presente nos tecidos tumorais¹⁵⁵. Como já discutido anteriormente, quando as moléculas do FS excitadas estão em seu estado tripleto, estas devem reagir com o oxigênio tecidual de maneira a gerar o oxigênio singleto que é o radical livre responsável pela oxidação tecidual promovida pela TFD, assim sendo, se o tecido alvo apresentar baixos níveis de oxigenação serão obtidos pobres resultados de oxidação.

A penetração da luz nos tecidos biológicos certamente é um fator que influencia fortemente os resultados obtidos com a TFD¹⁰², e esta depende diretamente do coeficiente de absorção dos diferentes tipos de tecidos e dos comprimentos de onda utilizados, que na TFD normalmente, são comprimentos de onda localizados na região visível do espectro eletromagnético (470 a 660nm). Algumas moléculas como a água, a hemoglobina e a bilirrubina que estão presentes nos tecidos absorvem intensamente os

principais comprimentos de onda utilizados na TFD, por este motivo foram desenvolvidos diferentes sistemas de entrega de luz baseados na utilização de fibras ópticas que podem ser posicionadas no interior dos tumores.

Em função de todas as limitações observadas, novas abordagens têm sido testadas para melhorar os resultados obtidos. Uma destas é a utilização da TFD de absorção dois fótons¹⁰¹, onde são utilizados dois fótons de menor energia (maior comprimento de onda) para promover a excitação dos FS, isto promove a maior penetração da luz, pois os comprimentos de onda utilizados se localizam na região do infravermelho próximo. Alguns trabalhos comentam que além do aumento da penetração da luz no tecido, o deslocamento da excitação para a região do infravermelho próximo pode evitar que parte de energia emitida seja desperdiçada em fenômenos de absorção e espalhamento de luz no tecido alvo^{103,101}.

Outras abordagens estão relacionadas com a entrega dos FS no interior das células. Atualmente, os FS estão sendo conjugados com diferentes nanopartículas⁹⁷ de origem poliméricas que são biodegradáveis, que atuam como moléculas carreadoras. A literatura relata que os mecanismos de ação dos FS conjugados não foram totalmente explorados e devem ser amplamente investigados antes de serem utilizados clinicamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Através da tabulação e análise dos dados obtidos, foi possível observar que, a maioria dos trabalhos publicados, e que estão disponíveis nas bases de dados utilizadas, investigam a eficiência da terapia fotodinâmica, em experimentações in vitro, utilizando o microorganismo *Streptococcus mutans*, a literatura também demonstra que alguns trabalhos estudam outros microrganismos, como *Streptococcus sobrinus* e

Streptococcus sanguinis que também estão relacionados com o processo cariioso. Além disso, fica evidente que os fotossensibilizadores mais utilizados são o azul de metileno e o azul de toluidina na questão do controle da cárie dental. Os dados obtidos demonstram que, até o momento as fontes de luz mais utilizadas são os LASERs, mas já existem indícios na literatura de que os equipamentos baseados na tecnologia dos LEDs devem ter a sua utilização aumentada.

Com relação aos protocolos de utilização da terapia fotodinâmica, a literatura levantada demonstra que não existe, até o presente momento, um consenso relacionado com as concentrações terapêuticas, doses de energia, potência, comprimento de onda e tipo de fotossensibilizador a serem utilizados. Com relação aos fotossensibilizadores pouco ainda se sabe sobre as características de penetração destes agentes nos biofilmes dentais, comportamento de ação em profundidade destes agentes e os reais mecanismos de ação nas células bacterianas.

Em função do levantamento e estudo da literatura atual, pode-se concluir que:

A TFD é uma modalidade terapêutica que apresenta consideráveis vantagens quando comparada aos tratamentos convencionais, como alta seletividade, tratamento minimamente invasivo, não induz ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes, pode ser utilizada de maneira recorrente, pode ser realizada em ambiente clínico e apesar dos excelentes resultados obtidos com esta técnica, nos mais diferentes campos de atuação, a literatura recomenda que novos estudos sejam realizados, de maneira que a dosimetria, a concentração, tipo de FS e os protocolos utilizados sejam amplamente investigados, promovendo dessa maneira, a obtenção de melhores resultados clínicos em associação com altos níveis de segurança.

REFERÊNCIAS

1. Ando A, Kumadaki I. Progress on the syntheses of fluorine analogs of natural porphyrins potentially useful for the diagnosis and therapy of certain cancers. *J Fluorine Chem.* 1999. 100;135-146.
 2. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 1991. 51;5993–6.
 3. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol, B.* 2006. 85; 28-38.
 4. Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008. 27; 227-238.
 5. Benov L, Batinic-Haberle I, Spasojevic I, Fridovich I. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. *Arch Biochem. Biophys.* 2002; 402: 159–16
 6. Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, Merchat M. Photosensitizing activity of
- * De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a Planktonic Culture. *Photomed Laser Surg.* 2007. 25; 513-8.
8. Byer RL. Diode Laser – Pumped Solid – State lasers. *Science.* 1988. 239; 742-747.
9. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. *Laryngoscope.* 1998. 108;1259-1268.
10. Boyle RW, Dolphin D. Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers. 1996, 3; 469-485.
11. Brancalion L, Moseley H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci.* 2002. 17;173-186.
12. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentin and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1995. 29;192-7.
13. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994. 22;273-8.
14. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitization of cariogenic bacteria to killing light from helium/neon laser. *J Med. Microbiol.* 1993. 38; 401-5.
15. Caminos D, Durantini E. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorg Med Chem.* 2006. 14; 4253-4259.
16. Caminos DA, Spesia MB, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-

- trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4- (trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem Photobiol Sci.* 2006. 5; 56-65.
17. Carvin JF. Des Bienfaits de L'insolation. Paris. In: Thierry Patrice (Editor). *Photodynamic Therapy*. Moan J, Peng Q. An outline history of PDT. RCS Publishing. France. 2003. p 1-18. Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences.. In: Bergasson RV, Jori G, Land EJ, Truscott TG. (Eds), *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*. Plenum Press, New York;1985. P. 209-227.
 18. Craford M, Holonyak N, Frederick K. In pursuit of the ultimate lamp. *Sci Am* 2001. 284; 62.
 19. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003. 18; 51-55.
 20. Cooper MP, Tan IB, Oppelaar H, Ruevekamp MC, Stewart FA. Metatetra(hydroxyphenyl) chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003.129; 709-711.
 21. Cortez LR, Nicolau RA. Terapia fotodinâmica na redução de cárie. Revisão de literatura. *Anais do X encontro latino americano de pós graduação. Faculdade de ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba. UNIVAP.* 2007
 22. Costa L, Alves E, Carvalho C, Tomé J, Faustino M, Neves M, Tomé A, Cavaleiro J, Cunha A, Almeida A. Sewage bacteriophage photoinactivation by

- cationic porphyrins: a study of charge effect. *Photochem Photobiol Sci.* 2008. 7; 415-422.
23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999. 284;1318–1322.
24. Danielmeyer HG, Ostermayer FW. Diode-Pump-Modulated Nd:YAG. *Laser J. Appl. Phys.* 1972. 43; 2911-14
25. da Hora Machado AE. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Quimica Nova.* 2000. 2; 237-243.
26. D'Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck.* 2004. 26;232-240
27. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008. 79; 2156-65.
28. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007. 78; 566-75.
29. Dilkes MG, DeJode ML, Rowntree-Taylor A, McGilligan JA, Kenyon GS, McKelvie P. m-THPC photodynamic therapy for head and neck cancer. *Lasers Med Sci.* 1996. 11;23-29.
30. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992. 37;883–887.

31. Dougherty TJ, Henderson B. Historical perspective: Schwartz S, Winkelman JW, Lipson RL. In: Henderson BW, Dougherty TJ, editors. Photodynamic therapy. New York: Marcel Dekker Inc. 1992. p.1–15.
32. Evensen JF, Sommer S, Moan J, Christense T. Tumor-localizing and Photosensitizing Properties of the Main Components of Hematoporphyrin Derivative. *Cancer Res.* 1984.44;482-486.
33. Fan KFM, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi GA, Bown SG. Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease in the oral cavity. *Int J Cancer.* 1997. 73;25-32.
34. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009. 36; 219-28.
35. Feyh J. Photodynamic therapy of head and neck tumors. *Adv Otorhinolaryngol.* 1995. 49;53-57.
36. Feyh J. Photodynamic treatment for cancers of the head and neck. *J Photochem Photobiol B.* 1996. 36;175-177.
37. Figge FHJ. The relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. AAAR Research Conference on Cancer. Science Press, Washington D.C. 1945. p. 147
38. Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic and traumatised tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948. 68; 640-641.

39. Fingar VH, et al. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer*. 1999. 79; 1702-8.
40. Fong DS. Photodynamic therapy with verteporfin for age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2000. 107; 2314-17.
41. Floyd TL. In: *Electric circuit fundamentals*. 2nd ed. Merrill;1991.
42. Freche C, De Corbiere S. Use of photodynamic therapy in the treatment of vocal cord carcinoma. *J Photochem Photobiol B*. 1990. 6;291-296.
43. Gabor F, Szocs K, Maillard P, Csik G. Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in *Escherichia coli* and *Enterococcus hirae* cells. *Radiat. Environ Biophys*. 2001. 40: 145–51.
44. Gonçalves PVAJ. *Aplicação da Terapia Fotodinâmica na redução de patógenos cariogênicos*. [Tese de Doutorado] Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 2009. Belo Horizonte. Minas Gerais.
45. Grancho JCP, Pereira MM, Miguel MDG, Gonçalves AMR, Burrows HD. Synthesis, spectra and photophysics of some free base tetrafluoroalkyl and tetrafluoroaryl porphyrins with potential applications in imaging. *Photochem Photobiol*. 2002. 75; 249-256.
46. Grant WE, Hopper C, Speight PM, Path MRC, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy of malignant and premalignant lesions in patients with ‘field cancerization’ of the oral cavity. *J Laryngol Otol*. 1993. 107; 1140-5.
47. Goslinski T, Konopka K. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007. 8: 694-707.

48. Gossner L, May A, Sroka R, Stolte M, Hahn EG, Ell C. Photodynamic destruction of high grade dysplasia and early carcinoma of the esophagus after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *Cancer*. 1999. 86; 1921-7.
49. Gould RG. "The LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation". In Franken PA, Sands RH. (Eds.). *The Ann Arbor Conference on Optical Pumping*, the University of Michigan, 15 June through 18 June 1959. p. 128.
50. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem.Photobiol.Sci*. 2004. 336– 45
51. Hasan T, Lin A, Yarmush D, Oseroff A, Yarmush M. Monoclonal antibody-chromophore conjugates as selective phototoxins. *Journal of Controlled Release*. 1989. 10, 107-117.
52. Hausmann W. Die sensibilisierende Wirkung des hamatoporphyrins. *Biochem*. (1911).
53. Holick MF, MacLaughlin JA, Parrish JA, Anderson RR. The photochemistry and photobiology of vitamin D. In: Regan JD, Parrish JA (Eds). *The Science of Photomedicine*. Plenum Press, New York, London. p. 195-21.
54. Hopper C, Kubler A, Lewis H, Tan IB, Putnam G. m-THPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2004. 111; 138-146.
55. Karamata B, Sickenberg M, van den Bergh H. A fibre optic light distributor for the preventive photodynamic therapy of secondary cataract. *Laser Med Sci*. 2000. 15;238-45.

56. Keyes RJ, Quist TM. Injection Luminescent Pumping of CaF₂:U³⁺ with GaAs Diode Lasers. *Appl. Phys. Lett.* 1964.4 ;50-53.
57. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972. 26;239–257.
58. Kim SY, Kwon OJ, Park JW. Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie.* 2001. 83; 437–444.
59. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochem. Photobiol.* 2000, 72; 676–680.
60. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Hematoporphyrin derivative: A new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1961. 42; 623-629.
61. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Further evaluation of the use of haematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Dis. Chest.* 1964. 46; 676-679.
62. Malik Z, Lugaci H. Destruction of erythroleukemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br. J. Cancer.* 1987. 56;589-595.
63. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1992. 14; 262–266.

64. Marks PV, Belchetz PE, Saxena A, Igbaseimokumo U, Thomson S, Nelson M et al. Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II – an early report. *Br J Neurosurg.* 2000. 14:317-25.
65. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G: Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 1996. 32:153-157.
66. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J antimicrob Chemother* 2006; 58: 190-192.
67. Mironov AF, Nizhnik AN, Yu A. Nockel, Hematoporphyrin derivatives: An oligomeric composition study, *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 1990. 4; 297-306.
68. Moan J, Sandberg S, Christensen T, Elander S. Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1983. 160; 165–179.
69. Moan J, Sandberg S, Christensen T, Elander S. Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. In: Kessel D, Dougherty TJ (Eds). *Porphyrin photosensitization.* Plenum Publishing Co. 1985. 1; 165-69.
70. Moan J, Rimington C, Western A. Hematoporphyrin ethers Vol. 111 Cellular uptake and photosensitizing properties. *Int. J. Biochem.* 1988. 20; 1401-1404.
71. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 1992. 55; 89-96.

72. Nitzan Y, Ashkenazi H. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. *Curr. Microbiol.* 2001; 42: 408–14.
73. 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; 86-90.
74. Okunaka T, Harubimi K, Konaka C, Kawate N, Bonaminio A, Yamamoto H et al. Photodynamic therapy for multiple primary bronchogenic carcinoma. *Cancer.* 1991. 68;253–8.
75. Panjehpour M, Overholt BF, Haydek JM. Light sources and delivery devices for photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc Clin North Am.* 2000. 10;513-32.
76. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei JR. G, Tedesco AC, Iancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 2005. 50: 353-359.
77. Raab O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol* 39:524–546. In: Tim Maisch. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007. 22; 83–91
78. Reddy VN, Rekha RK, Chandana G, Sehrawat S. Photodynamic Therapy. *Indian Journal of Dental Advancements.* 2009. 1;1.
79. "Sir Alexander Fleming - Biography". Nobelprize.org. 13 Dec 2011
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html

80. Schuller DE, McCaughan JS Jr, Rock RP 1985. Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol.* 1985. 111; 351-355.
81. Schweitzer VG. PHOTOFRIN-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies. *Lasers Surg Med.* 2001. 29;305-313.
82. Spesia MB, Lazzeri D, Pascual L, Rovera M, Durantini EN. Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005. 44;289-295.
83. Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 1998. 17; 4151-4202.
84. Szeimies RM, Rudiger H, Baumler W, Heine A, Landthaler M. A possible new incoherent lamp for photodynamic treatment of superficial skin lesions. *Acta Derm Venereol.* 1994. 74; 117–19.
85. Tolstykh PI, Stranadko EF, Koraboev UM, Urinov A, Tolstykh MP, Terekhova RP, Volkova NN, Duvanskii VA. Experimental study of photodynamic effect on bacterial wound microflora. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001. 85–7.
86. Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.* 2003. 21;103–124.
87. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *LasersSurg. Med.* 2001. 29: 165–73.

88. von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluorescierenden Stoffen. Munch. Med. Wochenschr. 1903. 47; 2042-2044.
89. von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. Arch. Klin. Med. 1904. 80; 427-487.
90. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. J Antimicrob Chemoter. 2005; 56: 324-30.
91. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. Eur. J. Oral Sci. 2006. 114: 64-9.
92. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br. J.Dermatol. 2001. 144: 274–278.
93. Zhou B, Kane TJ, Dixon GJ, Byer RL. Efficient, frequency-stable laser-diode-pumped Nd:YAG laser. Optics Letters. 1985. 10; 62-64.
94. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemother. 1998. 42;13–28.
95. Wainwright M. Pathogen inactivation in blood products. Current Medicinal Chemistry. 2002. 9; 127–143.
96. Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. Int Biodeterior Biodegrad. 2004. 53;119-126.

97. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. *Caries Res* 2004; 38: 530–536.
98. Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM, Adam G. Light propagation in animal tissues in the wavelength range 375–825 nanometers. In: Doiron DR, Gomer CJ, eds. *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*. Liss Inc, New York, 1984. p.115–132.
99. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 2008. 53;R61–R109.
100. Wilson BC, Patterson MS. The physics of photodynamic therapy *Phys. Med. Biol.* 1986. 31; 327–60.
101. Wilson BC. Photonic and non photonic-based nanoparticles for cancer imaging and therapeutics. *Photon Based Nanoscience and Nanobiotechnology*. 2006. ed J Dubowski and S Tanev (Netherlands: Springer) pp 121–51.
102. Wilson, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993. 75; 299–306.
103. Wilson M, Boson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993. 8; 182-7
104. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser irradiation. *Curr Microbiol*. 1992. 25; 77-81

105. Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci. Prog.* 1995. 78; 19-34.
106. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power-laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995. 78;569-74.
107. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1996. 37; 377–81.
108. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum and pre-irradiation time. *Lasers in Surgery and Medicine.* 1995. 16; 272–6.
109. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J photchem Photbiol B.* 1999. 50;1-7.

4 CAPÍTULO 2

Estudo da viabilidade da Terapia fotodinâmica em células planctônicas de *Streptococcus mutans*

Autores: Fernando Luis Esteban Florez, Marina Constante Gabriel Del Arco, Sergio Luis de Souza Salvador, Vanderlei Salvador Bagnato, Osmir Batista de Oliveira Júnior.

ABSTRACT:

The first antibiotics appeared in the beginning of the 20th century. The indiscriminate use of those agents have lead more recently, to the appearance of resistant bacteria strains. This crescent problematic boosted the development of new approaches and techniques that promote the control over microbial local infections and that avoid the development of new resistant bacteria strains.. The objective of this work was the assessment of viability of the PDTA with LED using Curcumin, Hypericin and Photogem as photosentizers in planktonic cultures of *Streptococcus mutans*. It was used a standard S. mutans strain (ATCC 25175 - Adolfo Lutz - SP), a LED based device, named as Biotable with three visible wavelengths (LAT - IFSC/ USP), the PS Curcumin and Hypericin (PDT Pharma - Ribeirão Preto - SP) and the Photogem PS (TimTec - Moscow - Russia). The obtained results demonstrate that the PS Photogem and Hypericin, promoted significant reductions when compared with the control group. These reductions were in the order of 6logs up to the bacteria total eradication. In that way the antimicrobial photodynamic therapy in planktonic cultures demonstrated important potential in the treatment of localized lesions of bacterial origin.

RESUMO:

No início do século XX surgiram os primeiros antibióticos. O uso indiscriminado destes agentes levou mais recentemente, ao surgimento de cepas bacterianas resistentes. Esta crescente problemática impulsionou o desenvolvimento de novas abordagens e técnicas que promovam o controle microbiológico de infecções locais e que evitem o surgimento de cepas bacterianas resistentes. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a eficiência da TFDA com LED utilizando os FS Curcumina, Hipericina e Photogem[®] em cultura de células planctônicas de *Streptococcus mutans*. Para tal, foi utilizada uma cepa bacteriana padrão (ATCC 25175 – Adolfo Lutz – SP), um sistema de irradiação a base de LEDs chamado Biotable com três comprimentos de onda visíveis (LAT - IFSC/USP), os FS Curcumina e Hipericina (PDT Pharma – Ribeirão Preto – SP) e o FS Photogem (TimTec – Moscow – Russia). Os resultados obtidos demonstram que os FS Photogem e Hipericina, promoveram reduções microbianas significativas quando comparados ao grupo controle enquanto Curcumina não demonstrou este efeito. Estas reduções foram a partir de 6 logs até a total erradicação do MO. A TFDA em culturas de células planctônicas demonstrou potencial para a prevenção e tratamento da cárie dental

Palavras chave: Terapia fotodinâmica, microbiologia, Cárie Dentária, *Streptococcus mutans*, Descontaminação

INTRODUÇÃO

O corpo humano possui um impressionante sistema de defesa contra infecções que é conhecido como sistema imunológico^{2,24} (SI), este sistema é muito eficaz, altamente complexo e atua de forma independente da vontade do hospedeiro. O mecanismo de atuação do SI é específico e dependente do agente agressor (antígeno), ou seja, uma vez que exista o contato do antígeno com o organismo, uma série de

reações é desencadeada de maneira que o SI possa desenvolver e produzir o anticorpo específico para combater o antígeno em particular¹².

Em 1928, em função da observação de Sir Alexander Fleming³¹, que descreveu a destruição de colônias de *Staphylococcus aureus* quando colocadas em contato com fungos do gênero *Penicillium notatum*, surge a Penicilina e a era dos antibióticos⁴. Os antibióticos são substâncias químicas, de origem natural, semi-sintética ou sintética que, possuem ação bactericida e/ou bacteriostáticas^{3,22}.

O uso destas drogas fez com que algumas doenças, que na época eram consideradas incuráveis, fossem a partir de então, totalmente erradicadas⁸, tanto que, em 1969 Willian Stewart²⁷, diretor nacional de saúde dos USA, comenta de forma positiva a utilização dos antibióticos, ele dizia que aquele era o momento de encerrar as pesquisas relativas às doenças infecto-bacterianas, nessa situação ele considerava que os antibióticos eram a solução definitiva para o tratamento de tais doenças.

Mas com o passar dos anos, o que se observa é o surgimento de relatos, cada vez mais frequentes, acerca do surgimento de resistência bacteriana^{5,27}, de maneira associada ao uso destes medicamentos. Como exemplos desta resistência, podem ser citados o tratamento da *Neisseria gonorrhoea* com penicilina, que nos dias de hoje apresentam índices de resistência em torno de 90%³⁴ e o resurgimento de doenças como a tuberculose, que já foram consideradas como doenças totalmente erradicadas.

As bactérias, apresentam dois tipos de resistência á agentes antimicrobianos, a resistência de origem natural e a resistência adquirida. A resistência de origem natural ocorre em função de ausência de estrutura ou via metabólica alvo, isto faz com que os agentes microbianos não promovam qualquer tipo de ação sobre estes MO em questão^{11,30,38}. A outra forma de resistência bacteriana é de origem adquirida e é o foco

de preocupação principal nos dias atuais⁹, uma vez que, neste caso, as bactérias se modificam de maneira a não serem mais sensibilizadas por agentes antimicrobianos até então efetivos. Estas modificações ocorrem por meio de mutações simples³⁸, por meio de seleção natural ou ainda, por meio de recombinação após transferência de genes, e como os MO se multiplicam rapidamente, estas mutações acabam sendo perpetuadas através das gerações^{4,14,21,25,32-34,36,40}.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) é uma nova modalidade terapêutica que tem a sua ação baseada na utilização de comprimentos de onda na região visível do espectro eletromagnético, e fotossensibilizadores (FS) não tóxicos que, quando associados promovem a morte bacteriana através de um efeito foto-físico¹⁹.

Os FS são substâncias químicas de origem animal, vegetal ou sintética⁷ que, apresentam uma série de anéis aromáticos, são atóxicos em condições normais, mas, quando irradiados com comprimentos de onda específicos, estes têm a capacidade de liberar uma série de radicais livres que promovem a morte bacteriana¹ (como descrito anteriormente).

Didaticamente, estas drogas podem ser divididas em três grupos ou gerações – ^{15,16}. As drogas de Primeira Geração, são as hematoporfirinas (Hp) e os derivados de hematoporfirinas (HpD), estas são sintetizadas a partir de sangue de origem animal e humano. Os principais FS desta geração são o Photogem[®], o Photosan[®] e o Photofrin[®]. As principais drogas de Segunda Geração são as ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas e as purpurinas¹⁵. Estas drogas têm um alto índice de pureza e pico máximo de absorção esta deslocado para a região compreendida entre 650nm-850nm o que facilita a utilização destas drogas em ambiente clínico. Comparativamente com as drogas de Primeira Geração, estas apresentam um rendimento maior na formação de

oxigênio singlete. As drogas de Terceira Geração nada mais são, do que as drogas de Segunda Geração ligadas á carreadores seletivos para melhorar a sua acumulação nos sítios de interesse. Especificamente para a cárie dental os fotossensibilizadores utilizados são o azul de metileno, o azul de toluidina e o rosa bengal. Porém estes fotossensibilizadores apresentam alto potencial de manchamento da estrutura dentária bem como de alguns materiais restauradores.

Os primeiros relatos acerca da utilização da TFDA datam do início do século XX, onde Oscar Raab e colaboradores verificaram que, alguns microrganismos eram inativados quando expostos á associações de corantes não tóxicos e comprimentos de onda visíveis em experimentos *in vitro*⁴¹. Os resultados destes experimentos permitiram aos autores concluir que, a terapia estudada apresentava potencial promissor para ser utilizada no controle microbiológico de lesões e, além disso, estes observaram que a TFD tinha sua eficiência significativamente reduzida quando aplicada em MO do tipo Gram-negativo^{13,20,26}.

Esta redução pode estar relacionada com os aspectos fisiológicos e estruturais que diferenciam uma célula Gram-positiva, de uma Gram-negativa, e que impedem a penetração do oxigênio singlete em regiões de interesse específico para a TFD. A membrana plasmática das células Gram-positivas é constituída de uma camada simples de peptidoglicanos, e por este motivo, as células pertencentes a este grupo apresentam alta permeabilidade ao meio externo, o que as torna mais susceptíveis á TFD.

As células Gram-negativas, por sua vez, possuem uma membrana plasmática com funções, arquitetura e composição, muito similares á aquelas encontradas nas células Gram-positivas, mas além desta estrutura, as células Gram-negativas possuem também uma parede celular que esta localizada mais externamente á membrana que

contém o citoplasma, esta parede celular é pouco permeável ao meio externo e ainda confere grande rigidez ao conjunto. Basicamente esta estrutura é composta por lipopolissacarídeos, proteínas e fosfolipídios que conferem aos microrganismos deste grupo, uma proteção mecânica e química extra aos agentes agressivos externos, o que torna estas células menos susceptíveis á TFD.

De maneira a obter melhores resultados de inativação bacteriana para os microrganismos do grupo Gram-negativo, diversos estudos têm investigado maneiras de aumentar a permeabilidade da parede celular aos FS utilizados na TFDA, e com isso garantir que a geração do oxigênio singleto ocorra no interior da célula. A literatura descreve que, o uso de algumas substâncias como o EDTA^{10,18,29,39} e os nanopeptídeos policatiônicos como o PMBN¹⁷ em conjunto com os FS, têm promovido a obtenção de reduções significativas dos MO que pertencem ao grupo Gram-negativo.

Estes trabalhos sugerem que estas associações são capazes de promover alterações importantes na camada de lipopolissacarídeos da parede celular, ou ainda, em alguns casos, a sua total ruptura. Outros trabalhos indicam que o sucesso da TFDA não depende da penetração do FS no interior da célula, e sim da capacidade que a associação do FS com a luz, tem de gerar grandes quantidades de oxigênio singleto nas redondezas da célula bacteriana²³, estes trabalhos afirmam que, uma vez que o oxigênio singleto tenha sido formado, a própria reatividade desta molécula, é capaz de oxidar de forma eficiente a parede celular destas bactérias e assim levá-las á morte.

Mais recentemente, a comunidade científica teve a sua atenção atraída para alguns tipos de medicamentos classificados como fitoterápicos, como a Curcumina e a Hipericina, que possuem ação antimicrobiana conhecida e ainda apresentam interessante potencial para a TFDA, uma vez que estes apresentam foto-toxicidade bastante elevada.

A curcumina, por exemplo, é uma substância de origem vegetal que é extraída do rizoma da *Curcuma Longa* e apresenta coloração amarelo ouro bastante acentuada. A descrição dos benefícios do uso deste agente no cuidado à saúde humana é corroborada por cerca de 3000 publicações científicas. Alguns trabalhos, como os realizados por Tønnesen et al. em 1987³⁷, e Dahl et al. em 1989⁶, evidenciam interessantes resultados antibacterianos para os MO dos grupos Gram-positivo e Gram-negativo promovidos pela curcumina diluída em DMSO em concentrações de 5-10%, nestes trabalhos foi descrita uma dependência entre a concentração da curcumina e os níveis de redução bacteriana encontrados.

Mais recentemente, o potencial clínico da Hipericina, vem sendo investigado como FS a ser utilizado na TFD para o tratamento de câncer, e alguns estudos sugerem que este corante possa ter grande aplicabilidade para o controle de microrganismos Gram-positivos.

O objetivo deste estudo é o de avaliar o potencial dos FS Hipericina, Photogem[®] e Curcumina como método alternativo de tratamento da cárie dental, avaliado através do nível de redução de *Streptococcus mutans* em suspensões planctônicas.

Foram testados protocolos de TFD arbitrariamente determinados a partir da característica absorvância da Curcumina, Hipericina e Photogemos e do padrão de diluição individual de cada uma dessas drogas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi adquirida, do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – SP), uma cepa de *Streptococcus mutans* de referência ATCC – 25175. Esta foi reativada em 5ml de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Lansing, MI, USA) em jarra de microaerofilia a 37°C (estufa de cultura bacteriológica, 410 NDRE, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) por 18 horas. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada (Revan Ciclo CI, 014117, Campinas, Brasil) em 3000 RPM por 5 minutos e as células lavadas por duas vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS) estéril.

Após reativação, estes foram cultivados em estufa apropriada em temperaturas de 36°C por um período de 24 a 48 horas. Em seguida, o material resultante teve a sua turbidez ajustada visualmente de maneira a obter turbidez igual metade do grau um da escala de McFarland, o que significa uma população de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Para todos os fotossensibilizadores testados os grupos 1 a 3 foram constituídos pelos seguintes controles: G1 – suspensão planctônica de *S. mutans* sem nenhum tratamento; G2 – suspensão planctônica + 50 µl de álcool (98°) e G3 – 500 µl de solução de cloridrato de clorexidina 2%.

Foi utilizado uma banda espectral específica para cada um dos fotossensibilizadores em função de seus picos máximos de absorção de energia. Assim, a curcumina foi irradiada por LED azul (450 ± 10 nm – 45mW/cm^2), a hipericina por LED amarelo (590 ± 10 nm – 55mW/cm^2) e o Photogem por LED vermelho (630 ± 10 nm 35mW/cm^2).

Foram constituídos 15 grupos experimentais para cada fotossensibilizador a saber:

Quadro 1. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador curcumina.

Curcumina		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	40
G5	--	80
G6	--	120
G7	250	--
G8	750	--
G9	1500	--
G10	250	40
G11	250	80
G12	250	120
G13	750	40
G14	750	80
G15	750	120
G16	1500	40
G17	1500	80
G18	1500	120

Quadro 2. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador Hipericina.

Hipericina		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	1
G5	--	3
G6	--	6
G7	1	--
G8	5	--
G9	10	--
G10	1	1
G11	1	3
G12	1	6
G13	5	1
G14	5	3
G15	5	6
G16	10	1
G17	10	3
G18	10	6

Quadro 3. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador photogem.

Photogem©		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	40
G5	--	80
G6	--	120
G7	1	--
G8	5	--
G9	10	--
G10	1	40
G11	1	80
G12	1	120
G13	5	40
G14	5	80
G15	5	120
G16	10	40
G17	10	80
G18	10	120

A seguir os fotossensibilizadores Curcumina, Hipericina e o Photogem foram manipulados e diluídos em três diferentes concentrações como segue: i) Curcumina – 1500mg/l; 750mg/l e 250mg/l; ii) Hipericina – 10mg/l; 5mg/l e 1mg/l e iii) Photogem – 10mg/l; 5mg/l e 1mg/l. Após o processo de diluição estes fotossensibilizadores se encontravam em suas concentrações terapêuticas e foram acondicionados em ambiente refrigerado a 4°C de temperatura em tubos de ensaio que garantiam total abrigo da luz até o momento em que estes fotossensibilizadores fossem utilizados.

Um dispositivo de irradiação contendo os comprimentos de onda específicos para cada um dos fotossensibilizadores foi utilizado. Este equipamento foi projetado e construído pelo laboratório de apoio tecnológico – LAT do Instituto de Física de São Carlos – IFSC da Universidade de São Paulo de maneira a estar em concordância com a maior absorção dos fármacos.

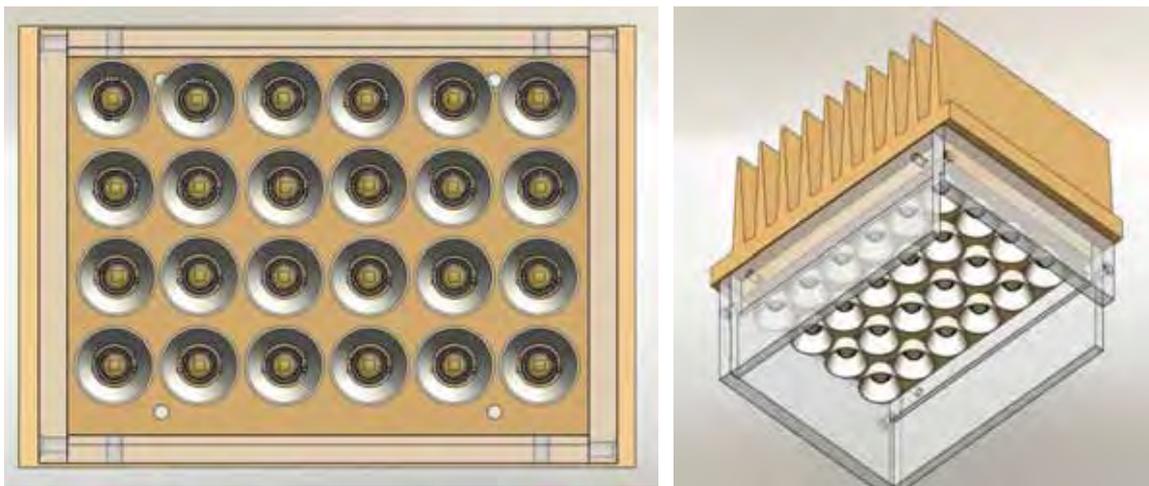


FIGURA 1. Desenho esquemático do dispositivo de irradiação da placa de cultura de 24 poços. (Direitos de imagem reservados ao LAT – Laboratório de Apoio tecnológico – IFSC/ USP).

Com os requisitos básicos de experimentação preenchidos, alíquotas de 500 μ l da suspensão mãe de *Streptococcus mutans* foram separadas da solução mãe e foram acondicionadas de forma individual, com o auxílio de uma pipeta previamente calibrada, em cada um dos 24 poços de fundo chato das Microplacas utilizadas. À seguir e com o auxílio de uma segunda pipeta calibrada, foram adicionados a estas alíquotas uma quantidade de 100 μ l dos fotossensibilizadores em cada uma das concentrações terapêuticas previamente estabelecidas.



a)



b)

FIGURA 2. a) Fotografia da Estufa microbiológica utilizada no projeto; b) Aspecto visual da suspensão mãe utilizada na experimentação em solução planctônica;

Imediatamente após foram adicionados cada um dos fotossensibilizadores ao inóculo já vertido nos poços da placa de wel (alíquotas de 500µl). Em seguida as placas de acrílico transparente foram posicionadas no interior da biotable na qual foram irradiadas nos tempos e doses descritas (Quadros 1,2 e 3)



a)



b)

FIGURA 3. a) Detalhe do equipamento de irradiação denominado Biotable's (Protótipo – LAT/ IFSC-USP); b) Detalhe da placa de 24 poços com inóculo e fotossensibilizador sendo acondicionado no interior da Biotable.

Após a irradiação, o conteúdo de cada um dos poços foi, de maneira individual coletado com auxílio de uma pipeta calibrada e agitadas pelo tempo de um minuto para

homogeneização em Vortex (Quimis – SS Labor Equipamentos e produtos médicos). Imediatamente, foram diluídas através do processo de diluição decimal como mostra na figura 4.

Em seguida, cada um dos tubos de ensaio foi agitado por 1 minuto com auxílio de um vortex, após estes processo, 50µl de cada suspensão foi plaqueado em placas de Petri contendo meio de cultura (BHI – Bacto Casitone – Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD - USA) para o crescimento dos *Streptococcus mutans*. Após o plaqueamento estas placas foram acondicionadas em jarras microbiológicas para microaerofilia, em seguida estas jarras foram incubadas em estufa com temperatura estabilizada em 36°C por um período de 72 horas.



FIGURA 4. Desenho esquemático que evidencia o processo de diluição decimal ao qual as amostras serão submetidas imediatamente após que a terapia fotodinâmica tenha sido concluída.

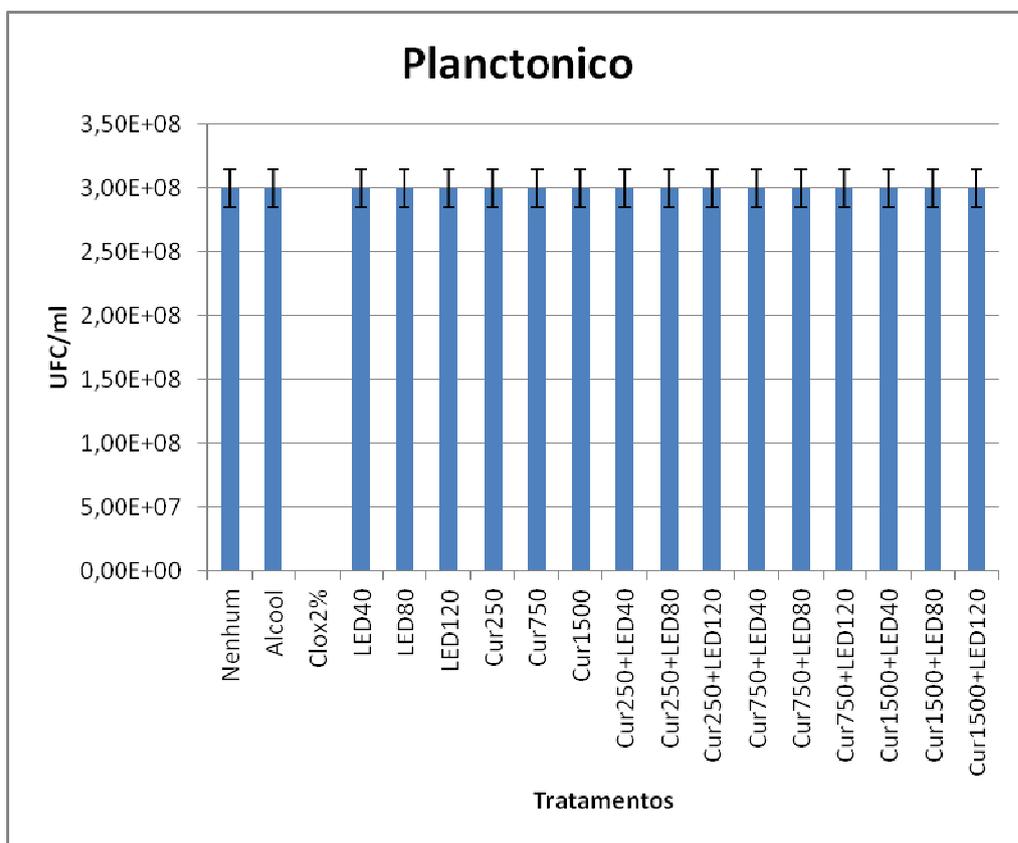
Ao final do tempo de incubação, as placas foram retiradas da estufa e o efeito antibacteriano da TFDA com os sistemas a base de LED foi analisado por processo de visual de colônias. Esta contagem foi realizada nas placas onde existissem entre 3 e 300 UFC.

Estes testes foram realizados em duplicata conforme procedimento microbiológico padrão

RESULTADOS

A media de crescimento de s. mutans em UFC após os diferentes protocolos de TFDA (Quadro 1), representativo do potencial anti-bacteriano das técnicas está representado nos gráficos 1-3 a seguir:

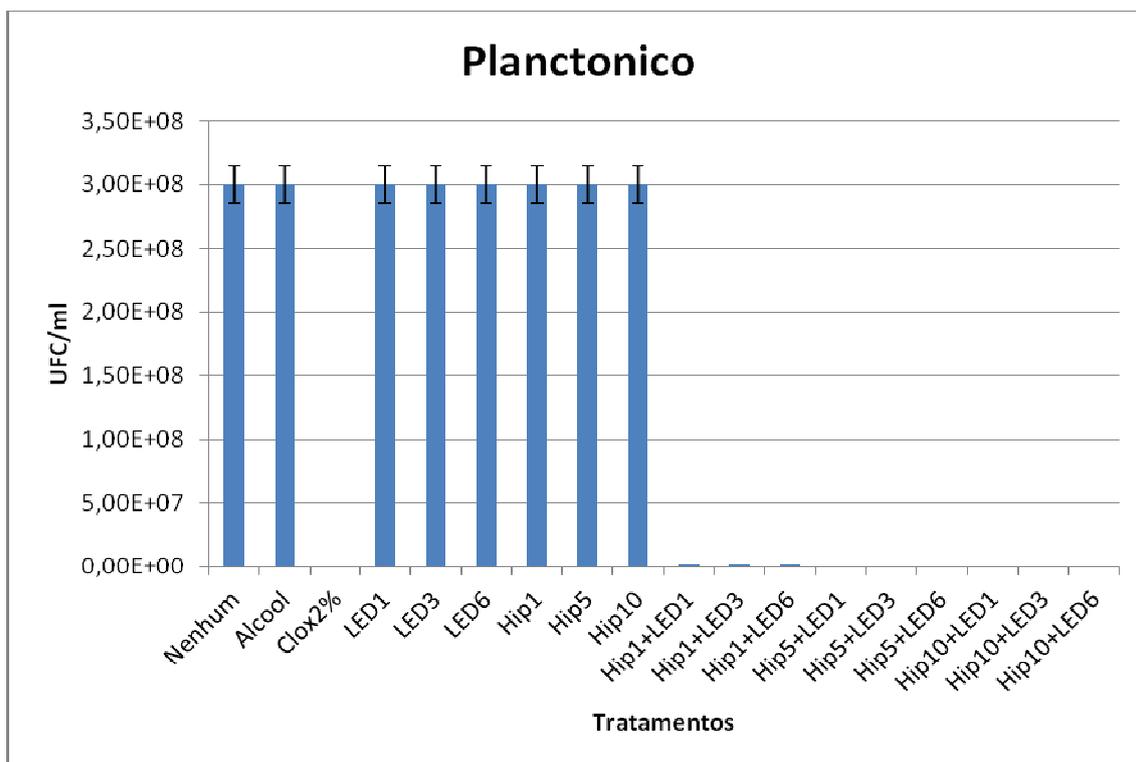
Gráfico 1 – Efeito de TFDA sobre Streptococcus mutans para fotossensibilizador curcumina em função de concentração e dose de energia



Pode-se observar que o único tratamento efetivo foi o controle positivo (clorexidina 2% por 36'36''). Todos os demais tratamentos, mesmo os que utilizaram a TFDA (Curcumina+dose de energia) não resultaram em efeito antibacteriano ou

fotodinâmico. Da mesma forma, o uso isolado do fotossensibilizador ou somente da irradiação LED também não mostrou qualquer efeito contra *Streptococcus mutans*.

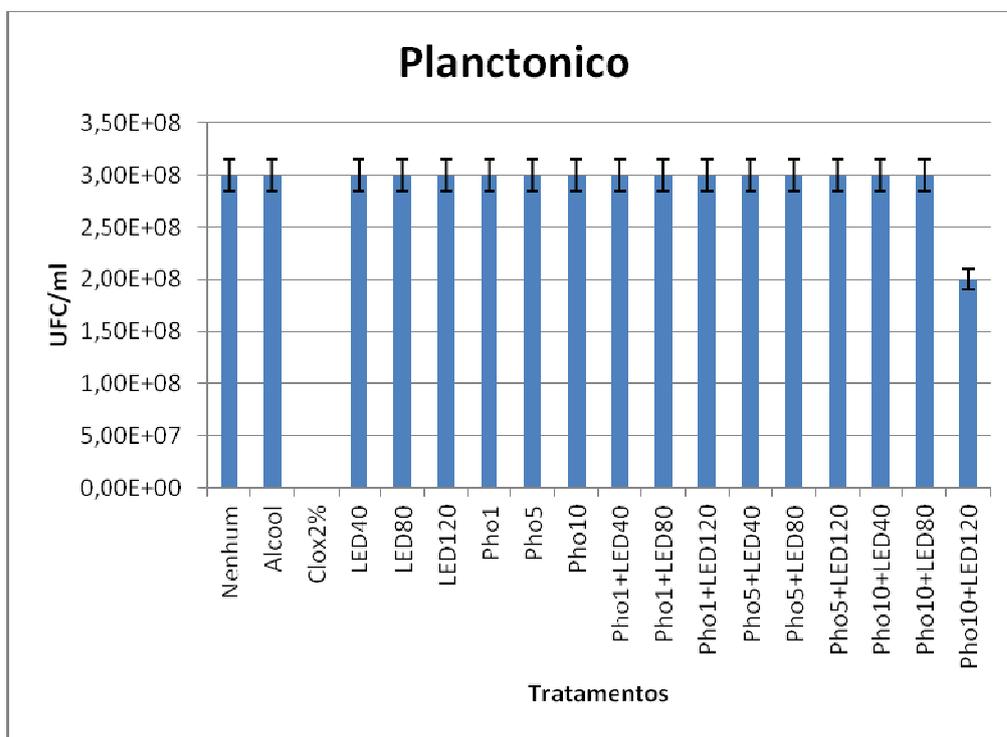
Gráfico 2 – Efeito de TFDA sobre *Streptococcus mutans* para fotossensibilizador hipericina em função de concentração e dose de energia.



Para este fotossensibilizador pode-se comprovar efeito fotodinâmico para todos os protocolos de TFDA utilizados (Hipericina+LED), Este efeito fica comprovado quando se observa que o uso isolado só do fotossensibilizador ou da luz LED não promove qualquer redução na contagem de *S. mutans*.

Para este fotossensibilizador, o efeito antibacteriano é similar ao controle positivo (clorexidina 2%).

Gráfico 3 – Efeito de TFDA sobre *Streptococcus mutans* para fotossensibilizador hematoporfirina em função de concentração e dose de energia.



Para o Photogem[®] observa-se efeito inibitório apenas para o protocolo mais agressivo (maior concentração da droga e maior dose de energia de ativação). Mesmo assim o resultado observado foi bem inferior ao obtido para o controle positivo – Clorexidina 2%.

DISCUSSÃO

A TFDA surge nos dias atuais como uma nova abordagem para controlar uma série de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos de interesse para a Odontologia. É uma técnica que, em função dos resultados obtidos neste trabalho, e em função dos relatos apresentados na literatura pertinente, apresenta potencial de grande interesse para ser utilizada em ambiente clínico. O mecanismo básico de ação desta terapia é a oxidação de moléculas orgânicas por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio de forma inespecífica, ou seja, não depende de uma via metabólico alvo ou

afinidade eletrônica. Acredita-se que este tipo de interação inespecífica, da TFDA com o MO, pode garantir a ausência do surgimento de resistência bacteriana adquirida.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial antimicrobiano da TFDA utilizando três FS em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Trabalhos como os publicados por Ciancaglini et al. em 2005, e por Pacheco et al. em 2007, corroboram os resultados por nós observados, os autores relatam sucesso no controle microbiológico de MO com a associação FS com luz em culturas de células planctônicas.

Em um estudo publicado por Colles et al. em 2006, os autores testaram a efetividade da TFDA em MO em soluções planctônicas e em biofilmes, estes utilizaram um FS a base de clorinas (Tolonium Chloride – USA) e um sistema de irradiação com faixa espectral de 633 ± 2 nm (Dentoflex – UK), e comprovaram que a TFDA quando aplicada em biofilmes apresenta efetividade bastante reduzida quando comparada com a efetividade da técnica em soluções planctônicas, os autores concluíram que esta diferença pode estar associada ao fato de o biofilme promover um ambiente de sobrevivência mais favorável aos MO.

Mais recentemente trabalhos como o de Li et. al. em 2008 descrevem resultados favoráveis no controle de *Streptococcus mutans* em biofilmes, neste trabalho em específico, os autores verificaram que o efeito da hematoporfirina monometil éter (HMME) de forma conjunta com a irradiação Laser de baixa intensidade, promoveu reduções de MO significativamente maiores do que os grupos tratados com a Clorhexidina a 0,05%.

Os resultados obtidos com a utilização do fármaco Curcumina, nas condições experimentais estudadas, sugerem que, este fármaco não apresenta ação efetiva no

controle do *Streptococcus mutans* quando em soluções planctônicas. Acreditamos que estes pobres resultados possam estar relacionados com fatores como concentração, tipo e propriedades físico-químicas inerentes pelo fotossensibilizador Curcumina. Além disso, alguns trabalhos, como por exemplo, o trabalho publicado por Zanin et.al⁴². descrevem que a utilização de um tempo de incubação pré-irradiação, pode promover o aumento significativo da morte microbiana. Estes autores ainda acreditam que este tempo de espera prévio á irradiação promove um aumento da incorporação do agente fotossensibilizador no interior do microorganismo.

Os dados obtidos com o fotossensibilizador Photogem[®] indicam que os grupos experimentais que utilizaram as menores concentrações, e tempos de irradiação, não demonstraram qualquer efetividade no controle dos microrganismos estudados. Além disso, estes resultados sugerem que a concentração do fármaco pode ser um fator de grande importância na obtenção de melhores índices de redução microbiana. Este fator de concentração associado á ausência do tempo de incubação pré-irradiação que foi imposta pelos protocolos terapêuticos utilizados, podem, em conjunto ter influenciado de forma significativa a obtenção de melhores resultados. O grupo experimental que utiliza a maior concentração da hematoporfirina, e o maior tempo de irradiação das amostras, foi capaz de promover reduções significativas na população microbiana estudada.

Os comprimentos de onda utilizados neste trabalho se localizam na região visível do espectro eletromagnético com regimes de irradiação em baixa intensidade de potência. De acordo com os resultados obtidos, os comprimentos de onda e o regime de irradiação, não foram capazes de promover quaisquer reduções microbianas quando estes foram utilizados de maneira isolada, ou seja, sem a presença dos fotossensibilizadores. Estes resultados são corroborados por diversos trabalhos^{18,19,23,42}

na literatura que descrevem que o efeito fotodinâmico só pode ser observado quando os comprimentos de onda são utilizados em conjunto com os fotossensibilizadores. Outros trabalhos⁶ relatam que alguns comprimentos de onda emitidos por fontes de luz Laser, em regimes de alta intensidade de potência são capazes de promover, por si só, reduções bacterianas significativas.

CONCLUSÕES

Dos fotossensibilizadores e protocolos de TFDA utilizados apenas hipericina mostrou efeito inibitório contra *Streptococcus mutans*, demonstrando que a associação deste fotossensibilizador com LED (590nm \pm 5nm) comprimento de onda, aplicado pelos tempos de 1'33'' e 3'15'' tem potencial de aplicação para controle bacteriano de *Streptococcus mutans* em saliva.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer a todos os Membros do laboratório de Biofotônica, do Grupo de Óptica, do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/ USP. Gostaríamos de agradecer de maneira especial ao Professor Sergio Luiz Salvador e á técnica de laboratório Marina Del Arcor, ambos da faculdade de Ciências Farmacêuticas, do departamento de Análises clínicas da Universidade de São Paulo pela grandiosa contribuição na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs C, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT .. Photodiagn Photodyn Ther. 2004. 1: 27-42.
2. Balestieri FMP. Imunologia. 2006. Editora Manole. 1ed. Barueri ,São Paulo.

3. Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial Agents. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1996, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG eds, Cap. 43.
4. Coffey TJ et al. Horizontal spread of an altered penicillin binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. FEMS Microbiol Lett. 1993. 110: 335-40.
5. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science. 1992. 257:1050-5.
6. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. Arch Microbiol. 1989. 151: 183-5.
7. Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. J Photochem Photobiol B. 1996. 36: 95-7.
8. Greenwood D. Historical Introduction, Antibiotic and Chemotherapy. 1997. Ed. Churchill Livingstone, O'Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D. editors. cap 1.
9. Gold HS, Moellering RC Jr. Antimicrobial-Drug Resistance. N Engl J Med. 1996. 355: 1445-53.
10. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004. 3: 436-50.
11. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. Bri Med Jour. 1998. 317: 657- 60.

12. Helm T. *Basic immunology: a primer*. Minn Med. 2004. 87: 40-4.
13. Hisonari A, Osamu Y, Hiroko K, Joji T, Jiro A. Effects of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* (1998). 42: 629-34.
14. Hyder SL, Streitfeld MM. Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *J Infect Dis.* 1978. 138: 281-6.
15. Juzeniene A, Moan J. The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2007. 4: 3-11.
16. Juzeniene A, Moan J. Recent advances in general PDT and ALA-PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2007. 4: 80-7.
17. Kameyama N, Matsuda S, Itano O, Ito A, Konno T, Arai T, Ishihara K, Ueda M, Kitagawa Y. Photodynamic Therapy Using an Anti-EGF Receptor Antibody Complexed with Verteporfin Nanoparticles: A Proof of Concept Study. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2011. 0 : 1-8.
18. Kömerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006. 25: 487-504.
19. Konopka K, Goslinski. Photodynamic therapy in Dentistry. *J Dent Res.* 2007. 86: 694-707.
20. Krzysztof T, Ben SC, Waleria H, Christopher GD . Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000. 45: 763-70.

21. Lacey RW. Antibiotic Resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance. *Bacteriol Rev.* 1975. 39: 1-32.
22. Livermore DM, Williams JD. B-Lactams: Mode of action and Mechanisms of Bacterial Resistance. *Antibio Lab Med.* 1996. Ed. Williams &Wilkins, Lorian V ed., cap. 12.
23. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R, Bäumlner W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. 2007. 104: 7223-8.
24. Male D, Roit I. Introdução ao sistema imune. IN: Roit I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* São Paulo; Manole. 1999. 1-11.
25. Manning PA, Achtman M. Cell-to-cell interactions in conjugating Escherichia coli: the involvement of the cell envelope. In *Bacterial outer membrane, biogenesis and functions.* Willey 1st ed. New York. 1979. 407-49.
26. Merle EO, HC Douglas W, Morck K, Andre G, Ronald RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Veter. Res.* 2002. 66: 86-92.
27. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 1992. 257: 1064-72.
28. Office of Public Health and Science (4 January 2007). "[Office of the Surgeon General: William H. Stewart \(1965-1969\)](#)". U.S. Department of Health and Human Services.

29. Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. 44: 3364-7.
30. Russell AD, Chopra I. In *Understanding antibacterial action and resistance*, 1st ed. Ellis Horwood, London, 1990.
31. Sir Alexander Fleming - Biography. Nobelprize.org. 27 Oct 2011. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html
32. Smith HO, Danner DB, Deich RA. Genetic Transformation. *Ann Rev Biochem.* 1981. 50: 41-68.
33. Smith AJ et. al. Contributors to antibiotic resistance. *Bri Med Jour.* 1999. 318: 669-73.
34. Spratt BG. Hybrid penicillin-binding in penicillin resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature.* 1988. 332: 137-6.
35. Talley RC, Crews JE. Framing the Public Health of Caregiving. *Am J Public Health.* 2007. 97: 224-8.
36. Tavares W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.* Atheneu, 2a edição, São Paulo, 1996.
37. Tønnesen HH, de Vries HD, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987. 76: 371-3.

38. Towner KJ. The problem of resistance. In: David Greenwood; Antimicrobial Chemotherapy, 3rd ed. Oxford University Press. Oxford, 1997.
39. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *JAntimicrob Chemother.* 1998. 42:13-28.
40. Willetts N., Skurray R. The conjugation system of F-like plasmids. *Ann Rev Genet.* 1980. 14: 41-76.
41. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Arch. Klin. Med.* 1904. 80: 427-87.
42. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemoter.* 2005; 56: 324-30.

5 CAPÍTULO 3

Estudo da viabilidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em biofilmes maduros de *Streptococcus mutans* utilizando os fármacos Curcumina, hipericina e hematoporfirina.

Autores: Fernando Luis Esteban Florez, Norberto Batista de Faria - Júnior, Juliane Tanomaru, Vanderlei Salvador Bagnato, Osmir Batista de Oliveira Júnior.

ABSTRACT:

The antimicrobial photodynamic therapy (APDT) is seen nowadays as an alternative treatment for localized lesions from bacterial origin. This therapy is based in the use of non toxic photosensitizers that when irradiated with visible wavelengths, are capable to generate free radicals that oxidize several organic molecules. This therapy arises in a critical moment, where the bacterial resistance reports are more common each day. The APDT, in contrary way to the antibiotics, operates in an unspecific way and does not depend of a target metabolic pathway, therefore, the appearance of bacterial resistance from the treatment is unlikely. The objective of this work was the assessment of the APDT efficiency in the control of mature biofilms of *S. mutans*. For that, 96 dentin/enamel samples were obtained. The biofilm was cultivated for two weeks in appropriate incubator at 37 C. A irradiation device named Biotable (LAT/IFSC - USP) was used, this device was developed to provide a homogeneous irradiation to the 24 wells plate. Three photosensitizers were chosen: i)Curcumina, ii)Hipericina, e iii)Photogem®. The obtained results were statistically analyzed by the ANOVA variance test, with the

use of Tukey post-hoc test, and these tests demonstrated significant differences ($P < 0,05$) intra-groups and differences were also found between the experimental groups and the control group. The proposed protocols were not able to promote the total eradication of the studied microorganisms and reductions up 56% were observed in the groups that used the Photogem ® as the photosensitizer.

Key words: Photodynamic therapy, microbiology, Dental decay, *Streptococcus mutans*, Decontamination, Biofilm.

RESUMO:

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) é vista nos dias de hoje como um tratamento alternativo para lesões localizadas de origem bacteriana. Esta se baseia na utilização de fotossensibilizadores não tóxicos que quando irradiados com comprimentos de onda visíveis, geram radicais livres que são capazes de oxidar uma série de moléculas orgânicas. A TFDA, ao contrário dos antibióticos, age de forma inespecífica e não depende de uma via metabólica, assim sendo, alguns trabalhos sugerem que este tipo de interação possa impedir o surgimento de resistência ao tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da TFDA no controle de biofilmes maduros de *Streptococcus mutans* visando sua aplicação no combate à cárie dental. Para tal foram obtidos 96 corpos de prova de esmalte e dentina bovinos. O biofilme foi cultivado a partir de uma cepa padrão ATCC15275 que foi incubado durante duas semanas em estufa apropriada em temperatura constante de 37°C. Foi utilizado um sistema de irradiação, denominado Biotable (LAT/ IFSC – USP), desenvolvido para irradiar de forma

homogênea placas de 24 poços. Os fotossensibilizadores utilizados foram i) Curcumina, ii) Hipericina, e iii) Photogem[®]. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos protocolos utilizados foi capaz de promover reduções estatísticas significativas.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica, microbiologia, Cárie Dentária, *Streptococcus mutans*, Descontaminação, Biofilme.

INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecto-contagiosa de origem bacteriana, de caráter multifatorial, irreversível, de evolução lenta e que acomete cerca de 60-90% da população mundial^{22,23,33}, esta independe de fatores sócio-econômicos ou culturais e é considerada atualmente como a terceira doença de maior prevalência, ficando atrás apenas das doenças do coração e do câncer.

Foram detectadas cerca de 700 espécies diferentes de microrganismo (MO) na cavidade bucal^{1,9,31}, estes apresentam funções muito importantes, tanto na manutenção da saúde bucal de um indivíduo quanto na etiologia de uma série de doenças^{21,38}, como por exemplo, a cárie e a doença periodontal. Na cavidade bucal os MO podem estar flutuando livremente na saliva ou podem se aderir à superfície dos elementos dentais. Quando não aderidos, estes fazem parte da flora bucal normal, não promovem quaisquer efeitos deletérios aos tecidos duros ou moles que compõe o sistema estomatognático, são deglutidas juntamente com a

saliva e são posteriormente inativadas no trato gastrointestinal por meio do sulco gástrico que está presente no estomago, estas células livres são conhecidas como células planctônicas.

O processo de adesão dos MO à superfície dental se dá conjuntamente com formação da película adquirida^{19,34}, que se forma imediata e continuamente após a limpeza mecânica caseira ou profissional dos dentes. Os MO que realizam a colonização inicial das superfícies dentais apresentam mecanismos específicos de adesão com a película adquirida (proteínas do tipo adesinas), os *Streptococcus*, por exemplo, tem afinidade de ligação com algumas proteínas ácidas ricas em prolina^{11,34}.

Em seguida à colonização inicial, ocorre a co-agregação bacteriana³⁵, que é um tipo de interação que ocorre entre espécies diferentes onde, os MO que não podem colonizar diretamente a superfície dental, se ligam de forma específica com alguns receptores presentes nas células colonizadoras iniciais (CCI) que promovem a adesão destas ao substrato existente (película adquirida + CCI). Este tipo de interação é um dos mecanismos mais importantes na colonização bacteriana, em geral, e do desenvolvimento do biofilme, em particular.

Por definição o biofilme dental (BD) é uma comunidade de MO diversos que são encontrados embebidos em uma matriz polimérica extracelular¹⁵. Esta tem sua origem compartilhada entre o hospedeiro e os MO presentes na flora bucal normal e se localiza nas superfícies duras que não descamam na boca. Atualmente o BD é considerado como único e verdadeiro agente etiológico do

processo cariioso e por este motivo se torna de fundamental importância, para a Odontologia, o desenvolvimento de estratégias que consigam controlar de forma eficiente a sua instalação e progressão.

Diversos trabalhos^{3,27,37,42} descrevem que, os MO presentes no BD apresentam resistência, aos agentes antimicrobianos, que variam entre 10-1000 vezes maior do que os MO planctônicos, estes trabalhos salientam também que esta resistência pode ser fruto da combinação de alguns fatores como a localização do MO no biofilme, a taxa de crescimento dos MO¹⁰, a espessura do biofilme³², a heterogeneidade de MO que compõe o BD² e a presença da matriz polimérica extracelular²⁷, que é formada a partir de polissacarídeos, e que fisicamente impede o contato íntimo dos agentes antimicrobianos com os MO.

Atualmente está disponível na odontologia moderna, uma série de técnicas e produtos que podem ser utilizados para prevenir e controlar a instalação, e a evolução do processo cariioso, e as técnicas mais utilizadas nos dias de hoje, ainda são aquelas que associam os procedimentos de profilaxia e raspagem, que mecanicamente removem a placa dental bacteriana (PDB) das superfícies dos elementos dentais, com a aplicação de tópicos de flúor ou agentes antimicrobianos como clorexidina ou triclosan na forma de solução, verniz ou creme dental.

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem que o uso diário de flúor diminui a incidência da lesão de cárie, tanto para crianças quanto para adultos, Saporito et al. em 2000³⁶, realizaram um estudo com escolares com idades na faixa entre 9 e 11 anos, que demonstrou que, a escovação com pastas contendo

monofluorofosfato sódico (NaF) a 0.76%, duas vezes ao dia promoveu um aumento estatisticamente significativo no aparecimento das lesões de cárie, o que evidencia que apenas a presença do flúor não é suficiente para evitar o aparecimento da lesão de cárie. Outros trabalhos investigaram a utilização do NaF a 0.24% em associação com 0.3% de Triclosan e observaram uma redução de 12-16% no aparecimento de lesões de cárie em adultos²³.

Mais recentemente surgiu a Terapia de Substituição⁴⁰, esta se baseia na introdução de MO não patogênicos, como por exemplo, o *Streptococcus mutans* não virulento, que de forma permanente coloniza a flora bucal do hospedeiro e passa a competir com os MO indígenas e dessa forma reduzem a incidência de cárie. Diversos trabalhos^{13,14,39} relatam resultados tanto positivos quanto negativos acerca desta nova terapia,.

Outra alternativa para o tratamento antimicrobiano da cárie dental é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)^{12,16,17,29,25,43}. A TFDA é uma técnica que tem o seu mecanismo de ação baseado na oxidação de moléculas orgânicas por meio da geração de oxigênio singleto^{20,41}. Basicamente esta ocorre em função da utilização de fontes de luz com comprimentos de ondas visíveis, operando em regime de baixa intensidade, em conjunto com corantes não tóxicos de origem vegetal, animal ou sintética.

Esta terapia tem a sua ação baseada na utilização de comprimentos de onda na região visível do espectro eletromagnético, e fotossensibilizadores (FS) não tóxicos que, quando associados promovem a morte bacteriana através de um

efeito foto-físico¹⁹. Basicamente a luz visível que é entregue ao FS, é capaz de promover uma alteração no nível de energia das moléculas do FS, ou seja, estas são levadas do seu estado fundamental (S_0) para um estado de maior energia (S_1).

Quando as moléculas se encontram no nível de energia mais alto (S_1), elas se tornam bastante reativas e instáveis. Nesta situação, elas podem decair espontaneamente para o seu estado fundamental de energia (S_0) liberando a energia adquirida de maneira vibracional (geração de calor), ou por meio da emissão de luz.

Outra situação possível de ocorrer, é a liberação de apenas parte da energia total que o FS adquiriu no momento da excitação, em geral esse decaimento parcial ocorre por vibração (geração de calor) e leva as moléculas a ocuparem um estágio energético intermediário (T_1) entre o estado fundamental (S_0) e o estado de maior energia (S_1). Quando a molécula está neste estado intermediário (T_1), a molécula de FS pode decair para o seu estado fundamental de energia (S_0) ou ainda pode interagir com outras biomoléculas, como por exemplo, o oxigênio tecidual. Neste segundo caso o FS ainda excitado, provoca uma alteração na orientação do spin no maior nível de energia do oxigênio tripleto (3O_2). Esta nova configuração eletrônica, promove uma mudança significativa no comportamento desta molécula, que a partir de então, passa a apresentar alta reatividade e é capaz de oxidar diversos compostos orgânicos. Estas moléculas são conhecidas como oxigênio singlete (1O_2), e as reações baseadas neste tipo de oxigênio são conhecidas normalmente como reações do tipo 2 e são as reações que caracterizam o efeito celular da terapia fotodinâmica.

Os fotossensibilizadores (FS) mais utilizados na terapia fotodinâmica (TFD) são o Photogem[®] o Photosan[®] e o Photofrin[®], que são drogas de primeira geração¹⁸, e que apesar da sua larga utilização na área médica, estas não são consideradas como FS ideais para a TFD, uma vez que, estas drogas apresentam altas taxas de impurezas, altas taxas de formação de agregados e pico máximo de absorção na região do ultravioleta.

Mais recentemente, e em função das dificuldades encontradas com a utilização das drogas de primeira geração, surgiram os FS de segunda geração¹⁸, como a curcumina e a hipericina. Diversos trabalhos^{28,32,41} in vitro têm demonstrado a efetividade destes FS em experimentos que utilizam células planctônicas, mas pouco material é encontrado sobre a utilização destes em biofilmes. O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência dos FS Curcumina, Hipericina e Photogem[®] em biofilme maduro de *Streptococcus mutans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* – ATCC 25175 que foram previamente adquiridas junto ao Instituto Adolpho Lutz. Estas cepas foram após o descongelamento das mesmas, submetidas ao processo de reativação e tiveram a sua pureza confirmada por intermédio da utilização da técnica de coloração de Gram em conjunto com a análise morfológica visual das colônias. Em seguida os microrganismo foram novamente reativados em 4,0 ml de caldo BHI, que é um meio de cultura de coloração amarela límpida e que é utilizado para o crescimento de uma grande variedade de *Streptococcus*.

Em seguida, os microrganismos já reativados, foram incubados em estufa apropriada por um período de 12 horas em temperatura controlada de 37°C, após este período, foi realizada análise de absorbância do meio de cultura contendo os microrganismos em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) de forma a ajustar a população bacteriana para no mínimo $3,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (ml).



FIGURA 1. a) Espectrofotômetro que será utilizado para avaliar e normalizar a quantidade da população inicial de microrganismo; b) Detalhe do display do equipamento evidenciando o comprimento de onda que será utilizado e o valor do coeficiente de absorção.

Em seguida, uma alíquota de 10% do volume utilizado para a contaminação dos espécimes foi adicionado ao meio de cultura estéril, foi realizada a sua homogeneização e posteriormente foi realizada a contaminação dos espécimes utilizando 2 ml da mistura do meio estéril com o inoculo.

Após, cada uma das pastilhas de esmalte e dentina que foram confeccionadas e esterilizadas previamente, foram acondicionadas de forma individual, com

auxílio de uma pinça metálica estéril no fundo chato das placas de microbiologia, a seguir, foram acrescentados a estas pastilhas 2,0ml do meio BHI puro contendo 10% da suspensão bacteriana, este volume de meio contendo o inoculo promoveu a completa cobertura das pastilhas. A seguir as placas foram acondicionadas em jarras microbiológicas em regime de microaerofilia, estas jarras serão posicionadas em uma incubadora de bancada com agitação orbital, a 37°C, durante duas semanas.



a)



b)

FIGURA 2. a) Incubadora com agitação orbital. b) Placa de 24 poços utilizada para crescimento do biofilme nas pastilhas.

A cada período de 48 horas, o meio de cultura (BHI) era completamente substituído por uma quantidade equivalente do mesmo meio de cultura recém preparado e sem adição de novos microrganismos. Após o período de incubação foi necessário comprovar o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de um biofilme viável para realizar o estudo.



FIGURA 3. Aspecto final de um biofilme maduro de *Streptococcus mutans* com 15 dias de maturação.

A seguir, as amostras que foram incubadas pelo período de quinze dias foram distribuídas nos grupos experimentais como descrito nos quadros 1,2 e 3:

Quadro 1. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador curcumina.

Curcumina		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	40
G5	--	80
G6	--	120
G7	250	--
G8	750	--
G9	1500	--
G10	250	40
G11	250	80
G12	250	120
G13	750	40
G14	750	80
G15	750	120
G16	1500	40
G17	1500	80
G18	1500	120

Quadro 2. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador Hipericina.

Photogem©		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	40
G5	--	80
G6	--	120
G7	1	--
G8	5	--
G9	10	--
G10	1	40
G11	1	80
G12	1	120
G13	5	40
G14	5	80
G15	5	120
G16	10	40
G17	10	80
G18	10	120

Quadro 3. Distribuição das amostras para o fotossensibilizador photogem.

Hipericina		
Grupos	Concentração (mg/L)	Dose de Energia (J/cm ²)
G4	--	1
G5	--	3
G6	--	6
G7	1	--
G8	5	--
G9	10	--
G10	1	1
G11	1	3
G12	1	6
G13	5	1
G14	5	3
G15	5	6
G16	10	1
G17	10	3
G18	10	6

A seguir os fotossensibilizadores Curcumina, Hipericina e o Photogem foram manipulados e diluídos em três diferentes concentrações como segue: i) Curcumina – 1500mg/l; 750mg/l e 250mg/l; ii) Hipericina – 10mg/l; 5mg/l e 1mg/l e iii) Photogem – 10mg/l; 5mg/l e 1mg/l. Após o processo de diluição estes fotossensibilizadores se encontravam em suas concentrações terapêuticas e foram acondicionados em ambiente refrigerado a 4°C de temperatura em tubos de ensaio que garantiam total abrigo da luz até o momento em que estes fotossensibilizadores fossem utilizados.

Um dispositivo de irradiação contendo os comprimentos de onda específicos para cada um dos fotossensibilizadores foi utilizado. Este equipamento foi projetado e construído pelo laboratório de apoio tecnológico – LAT do Instituto de Física de São Carlos – IFSC da Universidade de São Paulo de maneira a estar casado com a maior absorção dos fármacos.



FIGURA 5. Desenho esquemático do dispositivo de irradiação da placa de 24 poços (Direitos de imagem reservados ao LAT- Laboratório de apoio Tecnológico – IFSC/ USP).

Em seguida ao processo de irradiação de acordo com as situações impostas em cada um dos grupos experimentais, as amostras foram de forma individual removidas com auxílio de uma pinça metálica estéril e foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo uma solução salina tampão (PBS – Phosphate Buffered Saline) e três pérolas de vidro estéreis. Estes tubos de ensaio foram agitados com a utilização do vortex durante o período de 1 minuto de maneira a promover a desagregação mecânica do biofilme através do movimento colisional das pérolas de vidro com a superfície das pastilhas.

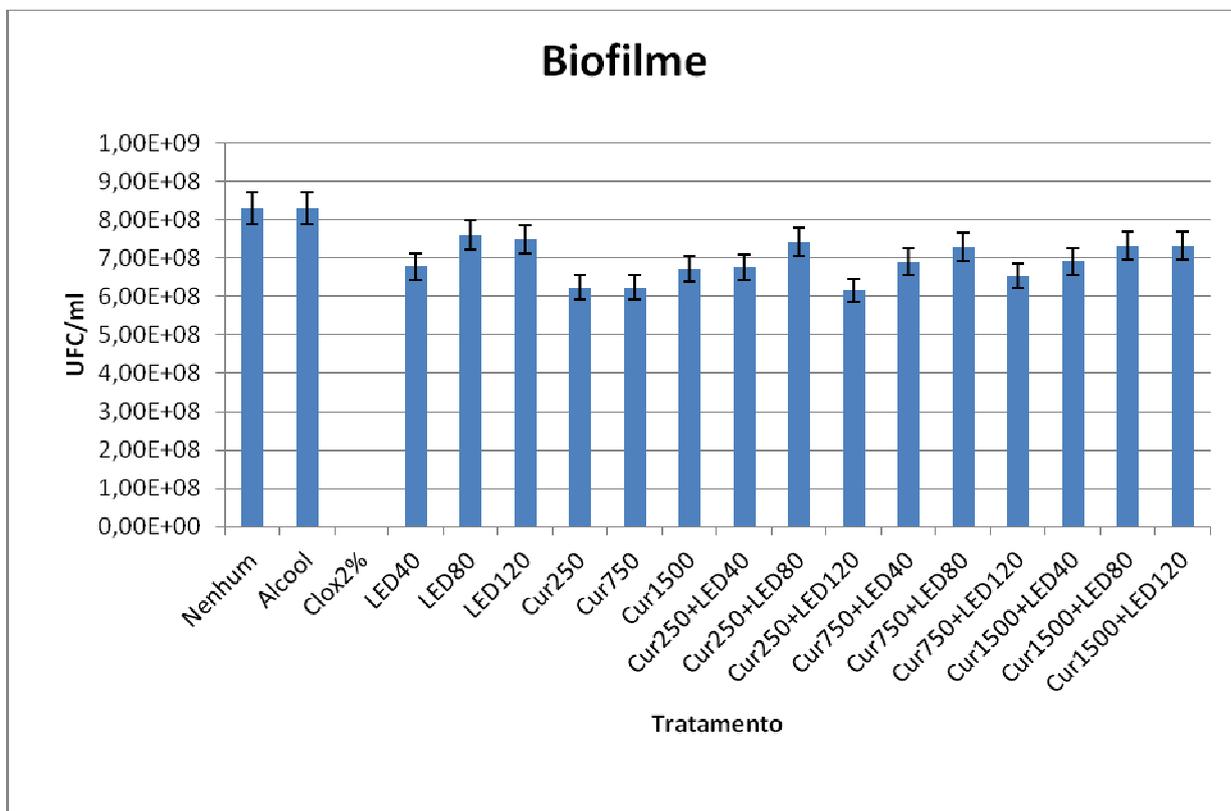
A seguir foram separados, de forma individual e com auxílio de uma pipeta previamente calibrada, 500µl do conteúdo de cada um dos tubos de ensaio, este volume foi diluído através do método de diluição decimal como descrito previamente, e a seguir às diluições, foram separados 10µl de cada uma das respectivas diluições que foram plaqueadas pela técnica da gota.

Em seguida estas placas de Petri já plaqueadas foram posicionadas dentro de jarras microbiológicas em ambiente de microaerofilia, e imediatamente após, estas foram acondicionadas em estufas microbiológicas a 37°C por um período de 48 horas de incubação. Após foi realizado o processo de contagem visual de colônias onde foi avaliada a eficácia dos diferentes regimes de irradiação e concentração de fármacos propostos.

RESULTADOS

A capacidade antibacteriana dos diferentes tratamentos em biofilmes de *S. mutans* pode ser observada nos gráficos 1-3 a seguir:

Gráfico 1. Efeito da terapia fotodinâmica sobre Streptococcus mutans para o fotossensibilizador curcumina em função da concentração e dose de energia (médias e intervalo de confiança).



Pode-se observar que o fotossensibilizador curcumina, utilizado isolado ou com TFDA não apresenta efeito antimicrobiano sobre biofilme cariogênico. As pequenas variações observadas não representam diferenças significativas de desempenho uma vez que todos os resultados estão na ordem de grandeza de 10^8 .

Gráfico 2 – Efeito de TFDA sobre biofilme de *Streptococcus mutans* para o fotossensibilizador hipericina em função de concentração e dose de energia (media e intervalo de confiança)

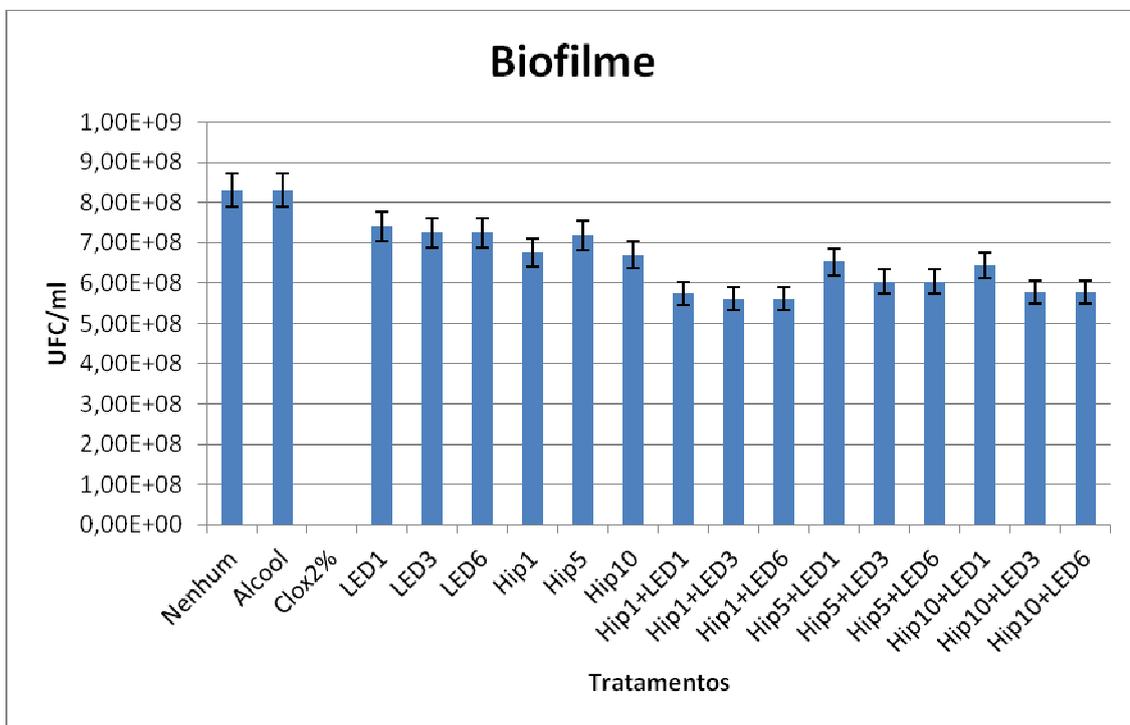
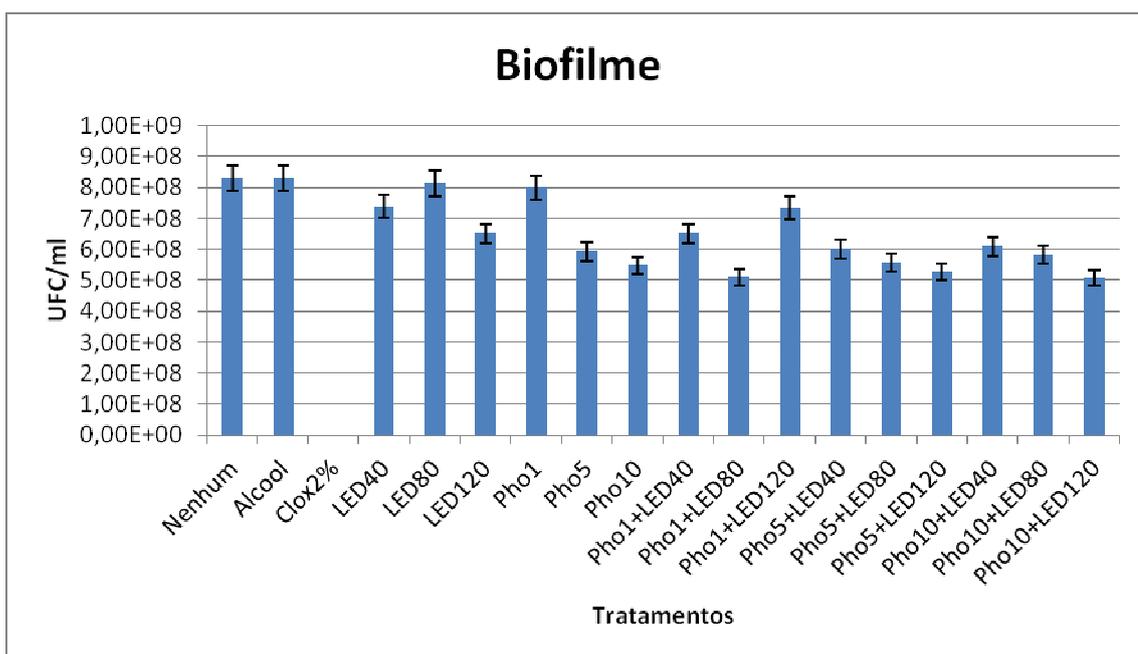


Gráfico 3 – Efeito de TFDA sobre biofilme de *S. mutans* para fotossensibilizador Photogem® em função de concentração e dose de energia (media e intervalo de confiança)



A mesma baixa efetividade pode ser observada para os fotossensibilizadores hipericina e Photogen®.

DISCUSSÃO

A cárie é uma doença infecto contagiosa de caráter multifatorial, de origem bacteriana e que acomete quaisquer superfícies dentais. As bactérias localizadas na placa dental, e que estão em íntimo contato com o dente, são capazes de metabolizar os carboidratos que estão presentes na dieta do hospedeiro, e como resultado natural do metabolismo bacteriano, os MO excretam ácidos (ácido láctico) que promovem a desmineralização do esmalte e da dentina através da diminuição do pH local. Por ser uma doença que apresenta altos índices de incidência e prevalência na população mundial, é de extrema importância que sejam desenvolvidas estratégias capazes de controlar a instalação e a progressão de tal doença.

O biofilme bacteriano é o verdadeiro agente etiológico do processo cariioso, e a sua formação é decorrente de uma série de etapas muito bem definidas. Inicialmente ocorre a formação da película adquirida (PA)^{15,19,34}. A PA é um filme extremamente fino que se forma na superfície dental 15 minutos após uma limpeza mecânica (p.ex. escovação ou profilaxia), esta é composta pela saliva e uma série de proteínas de origem do hospedeiro.

A seguir ocorre a colonização inicial, onde os MO chamados de colonizadores se aderem à PA por meio de uma afinidade eletrônica – Forças eletrostáticas repulsivas e Forças de Van Der Waals – que estes apresentam com

algumas das proteínas salivares presentes^{11,34}. Esta colonização inicial cria condições para que os MO secundários, que não apresentam afinidade com a PA consigam se aderir ao substrato existente, esta adesão ocorre de maneira específica entre os MO e é conhecida como co-agregação. A partir daí as multiplicações seriadas e as novas adesões bacterianas ao substrato levam à instalação e desenvolvimento do biofilme bacteriano dental.

Este biofilme é uma comunidade de MO que vivem de forma sinérgica organizada e que apresenta uma série de mecanismos de defesa contra agentes agressores externos, como por exemplo, os agentes antimicrobianos, o oxigênio e as células do sistema imunológico que estão presentes na saliva¹⁵. Alguns trabalhos³⁷ na literatura descrevem que os MO presentes em biofilmes apresentam resistência aos agentes antimicrobianos de 10 até 250 vezes maior do que quando comparados aos mesmos MO crescidos de forma planctônica.

Estes trabalhos descrevem que um dos principais mecanismos de defesa é a deposição da matriz polimérica de polissacarídeos, que funciona como uma barreira mecânica e impede que grande parte da comunidade bacteriana fique exposta à ação dos agentes citados^{15,27}. Outros trabalhos relatam que os MO que se encontram embebidos na matriz extracelular apresentam taxa de metabolismo celular mais baixa, e isto impede que as agressões do meio ambiente afetem de forma significativa a viabilidade dos MO do biofilme, além disso estes trabalhos acreditam que a própria heterogeneidade da população que constitui o biofilme pode promover o desenvolvimento de resistência^{2,10,33}.

Os resultados obtidos neste experimento, claramente demonstram que independentemente dos comprimentos de onda, das doses de energia e dos FS que foram utilizados, os protocolos aqui investigados, não foram capazes de promover a total erradicação dos MO, o que de fato demonstra que, quando os MO estudados estão organizados em forma de um biofilme maduro, estes apresentam resistência bastante elevada aos agentes agressores de modo geral e em particular aos protocolos aqui estudados.

Em uma revisão de literatura realizada por Marsh e Bradshaw em 1997²⁸, os autores discutem uma série de abordagens fisiológicas para controlar a instalação e o desenvolvimento de biofilmes, além disso, os autores, baseando-se em trabalhos da literatura sugerem que esta alta resistência microbiana pode estar relacionada com a homeostasia encontrada em biofilmes maduros. Outros trabalhos, como por exemplo, o trabalho realizado por Hamblin e Hasan em 2004¹², relatam a obtenção de reduções de até 99% em experimentos que estudaram a eficiência da TFDA que utilizou FS policatiônicos com períodos de incubação pré-irradiação de 1 minuto em MO como os *Actinomyces viscosus* e as *Porphyromonas gingivalis*.

Em vista dos resultados aqui apresentados, pode-se acreditar que o efeito fotodinâmico imposto pelos diferentes protocolos aqui propostos, tenha ocorrido externamente ao MO, ou seja, a liberação do oxigênio singlete ocorreu fora do citoplasma, e neste caso, o sucesso da terapia depende de uma relação probabilística que tem como fatores variáveis a concentração dos FS, a população de MO, a organização dos MO no biofilme e a permeabilidade da parede celular.

Alguns estudos atuais investigam maneiras de aumentar a permeabilidade da parede celular com a utilização de produtos como o EDTA^{4,8,16}, que apresenta a capacidade de remover os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , que são os responsáveis por neutralizar as cargas negativas na superfície da parede celular, como consequência, ocorre uma repulsão eletrostática intensa que leva à desestabilização da organização original e induz à liberação dos lipopolissacarídeos constituintes da parede celular, isto promove consequentemente, um aumento na penetração do FS no citoplasma bacteriano^{4,6,26,30}.

Outros trabalhos relatam que a efetividade da TFDA não depende da localização onde o oxigênio singlete é formado, de acordo com estes trabalhos, se uma quantidade suficiente de oxigênio for gerada nas redondezas das bactérias, esta molécula apresenta reatividade suficiente para penetrar na célula bacteriana e promover danos em estruturas vitais, os autores destes trabalhos comentam que esta característica pode ser observada em distâncias de até 20nm⁷. Hamblin e Hasan acreditam que os FS que preferencialmente operam via reações do Tipo I necessitam penetrar no interior das células bacterianas, enquanto que os FS que operam via reações do Tipo II não necessitam e portanto são mais eficientes¹².

CONCLUSÃO

Muito embora a TFDA apresente aspectos interessantes para ser utilizada na cavidade oral como técnica de tratamento e controle de doenças de origem bacteriana, nossos resultados demonstram que os protocolos aplicados não foram

eficazes sobre biofilme cariogênico. Um das observações mais importantes é que parece ser necessário um tempo de interação entre o fotossensibilizador e o biofilme a fim de possibilitar seu efeito fotodinâmico.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer a todos os Membros do laboratório de Biofotônica, do Grupo de Óptica, do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/ USP. Gostaríamos de agradecer de maneira especial a Professora Juliane Tanomaru e ao aluno de doutorado Norberto Júnior, ambos desta faculdade de Odontologia pela grandiosa contribuição na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS:

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721-5732.
2. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322:85-105.
3. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun.* 1998; 66:4729-4732.
4. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Van Lier J. Photosensitizing Activity of Water- and Lipid- Soluble Phthalocyanines on *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 71: 149– 156.

5. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, Lier Jv. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios*. 1992; 33-46.
6. Caminos DA, Spesia MB, Pons P, Durantini EN: Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra (4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 7:1071-1078.
7. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Comparison of killing Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol*. 1989; 171:2188-94.
8. Ehrenberg B, Malik Z, Nitzan Y, Ladan H, Johnson F, Hemmi G, Sessler J: The binding and photosensitization effects of tetrabenzoporphyrins and texaphyrin in bacterial cells. *Lasers Med Sci*. 1993; 8:197-203.
9. Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23:112-118.
10. Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc J Appl Microbiol*. 2002; 92(Suppl 1):98S-110S.
11. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC. Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem*. 2000; 275:8970-8974.

12. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious diseases? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3:436–450.
13. Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, van Der Weijden CC. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infect Immun* 2000;68:543-9.
14. Hillman JD, Chen A, Snoep JL. Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Infect Immun.* 1996; 64:4319-23.
15. Hojo K, Nagaoka S, Oshima T, Maeda N. Bacterial interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res.* 2009; 88: 982.
16. Jori G, Brown SB. Photosensitised inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3:403–405.
17. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Copellotti, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Ronucci G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2006; 38:468-81.
18. Juzeniene A, Moan J. The History of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy.* 2007; 4- 3-11.

19. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2002; 66:486-505.
20. Konopka K, Goslinsk T. Photodynamic Therapy in Dentistry. 2007. *J Dent Res.* 2007; 86:694-707.
21. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3944-3955.
22. Legler DW, Menaker L. Definição, etiologia, epidemiologia e implicações clínicas da cárie dentária, In: Menaker L, Morhart RE, Navia MJ, editores. *Cáries Dentárias – Bases Biológicas.* 1° ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1984; 186-199.
23. Maltz M. Cárie dental: fatores relacionados. In: PINTO, V.G. *Saúde bucal coletiva.* 4.ed. São Paulo: Santos, 2000; 319-339.
24. Mann J, Vered Y, Babayof I, Sintes J, Petrone ME, Volpe AR, et al. The comparative anticaries efficacy of a dentifrice containing 0.3 percent triclosan and 2.0 percent copolymer in a 0.243 percent sodium fluoride/silica base and a dentifrice containing 0.243 percent sodium fluoride/silica base: a two-year coronal caries clinical trial on adults in Israel. *J Clin Dent* 2001;12:71-6.
25. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol.Sci.* 2004; 3:907–917.

26. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gramnegative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol, B.* 1992; 262-266.
27. Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995;15:198-207.
28. Marsh PD, Bradshaw DJ. Advances in dental research. *Physiological Approaches to Control Oral Biofilms.* 1997; 11:176-185.
29. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffith J, Parish JH, Brown ST. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc-phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol Biol.* 1996; 32:159–164.
30. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitised porphyrins. *PhotochemPhotobiol.* 1992; 89-96.
31. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* 2000; 42:80-87.
32. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; 437:41-47.
33. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology.* 2003; 31 Suppl 1:3-23.

34. Rogers JD, Palmer RJ, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun.* 2001; 69:7046-7056.
35. Rosen G, Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 256:304-310.
36. Saporito RA, Boneta AR, Feldman CA, Cinotti W, Sintes JL, Stewart B, et al. Comparative anticaries efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrices: a two-year caries clinical trial on children in New Jersey and Puerto Rico. *Am J Dent.* 2000;13:221-6.
37. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22:333-339.
38. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002; 29:260-268.
39. Stashenko KP, Hillman JD. Microflora of plaque in rats following infection with an LDH-deficient mutant of *Streptococcus rattus*. *Caries Res* 1989; 23:375-7.
40. Tagg JR, Dierksen KP. Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends Biotechnol.* 2003; 21:217-23.
41. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42:13–28

42. Welin-Neilands J, Svensater G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 2007; 73:5633-5638.
43. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitiser. J Appl Bacteriol. 1995; 78:569–574.

6 DISCUSSÃO GERAL

A cárie dental é, sem sombra de dúvida, uma doença que causa grande impacto na saúde do ser humano, pois esta apresenta altos índices de incidência e prevalência na população mundial⁸⁶. Muito embora esta afecção não chegue a colocar em risco a saúde geral de um indivíduo, a sua instalação e progressão, podem comprometer consideravelmente o bem estar físico e emocional do hospedeiro, uma vez que, a evolução deste processo leva na maioria das vezes, á destruição total da coroa clinica do dente^{10,63,107}.

Esta destruição, afeta a capacidade de mastigação e trituração dos alimentos, gera problemas de oclusão e fonética, além de alterar em alguns casos a estética do paciente. Além disso, a progressão desta doença atinge alguns tecidos mais sensíveis, como por exemplo, a dentina e a polpa^{10,107}, que são extremamente afetados por esta infecção bacteriana o que acaba gerando altos níveis de dor. Normalmente estes sintomas extremamente dolorosos ocorrem em lesões de cárie que se encontram em estágios avançados de evolução, e o tratamento destas se dá usualmente por meio da remoção mecânica do tecido cariado em associação com

a realização do tratamento endodôntico radical e posterior restauração da função do elemento dental.

A lesão de cárie tem o seu início conjuntamente com o processo de adesão bacteriana que acontece nas diferentes superfícies dos elementos dentais^{17,93} (p.ex. lisas, cicatrículas, fissuras e radiculares), este processo ocorre de maneira geral, em três etapas distintas e muito bem definidas (colonização inicial, colonização secundária, ou co-agregação e proliferação), onde, em cada uma destas, diferentes microrganismo (MO), apresentam papéis de fundamental importância para a formação e manutenção do biofilme dental bacteriano (BD).

Por definição⁸⁶, a cárie dental é a destruição localizada dos tecidos duros (mineralizados) que constituem os elementos dentais por meio da dissolução dos cristais de hidróxiapatita. Esta ocorre como resultado da fermentação metabólica de açúcares e carboidratos presentes na dieta do hospedeiro, por alguns tipos de microrganismo (MO) presentes no BD, como por exemplo, os MO dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

Com relação à etiologia do processo cariioso, três são as teorias disponíveis⁷ e que foram propostas, de maneira a caracterizar os mecanismos de ação envolvidos no surgimento e desenvolvimento deste tipo de lesão. A primeira teoria foi proposta por Miller em 1890. Nesta época acreditava-se que todos os MO presentes no BD, eram capazes de produzir os ácidos orgânicos responsáveis pela dissolução dos tecidos duros dos dentes. Ainda de acordo com esta teoria, a única diferença entre a condição de saúde e de doença, era a quantidade de placa

que estava depositada nas superfícies dentais, esta hipótese ficou então conhecida como sendo a Teoria Químico-parasitária da Placa Inespecífica⁵⁷.

Mais recentemente surgiu a Teoria da Placa Específica⁵⁷⁻⁵⁹, que afirma que apenas alguns MO presentes no BD, são capazes de promover o desenvolvimento do processo carioso, e dentre todos os MO ali presentes (>700 espécies catalogadas), os MO do gênero *Streptococcus* são considerados como sendo os MO mais patogênicos, uma vez que, estes são altamente acidogênicos (produção de ácidos), acidúricos (tolerância a pH muito baixo), e ainda, são capazes de depositar uma matriz extracelular, de caráter polimérico (MPE), que é composta por polissacarídeos insolúveis, o que confere a estes MO, uma maior capacidade de agregação á superfície dental, bem como, maior resistência frente aos agentes agressores externos, como por exemplo, os agentes antimicrobianos ou MO competidores.

Nos últimos anos surge a hipótese Ecológica da Placa^{64,65}, que relaciona diretamente os fatores ambientais, com as mudanças comportamentais que podem ser observadas na microbiota da placa dental bacteriana. Neste contexto Marsh et al., publicaram alguns estudos dedicados a explicar a transição do comportamento comensal para o comportamento patogênico de alguns MO, e de acordo com estes autores, se os fatores ambientais são capazes promover alterações tão significativas no comportamento dos MO presentes no BD, pode ser possível, até certo grau, controlar o surgimento do processo carioso através da identificação e controle destes fatores.

Os autores relatam que os principais fatores ambientais a serem considerados no controle fisiológico do processo cariioso, são: i) controle do pH da placa; ii) controle do potencial redox e iii) controle do acesso aos nutrientes. Ao final destes estudos, os autores concluíram que as alterações ambientais podem de fato promover alterações na composição e metabolismo dos MO presentes no BD, mas estes acreditam que seja difícil prever o efeito que tais alterações possam implementar no comportamento dos MO, o que torna difícil a utilização destes como método principal no controle da instalação ou progressão do processo cariioso.

Tradicionalmente, diversas são as abordagens utilizadas na rotina clínica diária para controlar a instalação e a progressão do processo cariioso. Basicamente estas técnicas se dividem em mecânicas e químicas.

As técnicas mecânicas são aquelas em que o profissional lança mão da utilização de instrumentos cortantes manuais ou rotatórios, para realizar a remoção parcial ou completa dos tecidos dentinários que estejam comprometidos, sem suporte e que dessa maneira não possam mais continuar exercendo as suas funções naturais.

As técnicas químicas¹⁰⁰ são aquelas que utilizam de maneira tópica, a aplicação de agentes antimicrobianos como o digluconato de Clorexidina (CHX) e alguns tipos de antibióticos como as penicilinas, meticilinas, eritromicinas, ampicilinas e as cefalosporinas sobre as superfícies dos dentes. Mas, apesar do sucesso relativo alcançado por meio da utilização destas substâncias, os relatos de

efeitos colaterais, como por exemplo, descoloração dental, alteração do paladar do paciente, associados mais recentemente, ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos agentes antibióticos acabaram por restringir de maneira significativa a utilização destes métodos¹⁰⁴.

Neste contexto surge como uma alternativa promissora, para controlar os MO Gram-positivos e Gram-negativos presentes na microbiota indígena da cavidade bucal, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)¹⁰⁵. O mecanismo de ação desta se baseia na liberação de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete¹⁰¹, que apresentam a capacidade de oxidar diferentes moléculas orgânicas como bactérias, vírus e fungos.

De maneira a embasar a realização dos estudos presentes nos Capítulos 2 e 3 desta tese, o Capítulo - 1, teve por objetivo, realizar uma revisão da literatura que permitisse ao aluno e ao leitor, a observação, e o entendimento dos mecanismos de ação desta técnica terapêutica, e os diversos aspectos relacionados com o seu surgimento, a evolução, as limitações e as direções futuras que a terapia fotodinâmica (TFD), e a derivação desta, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), devem tomar de maneira a que esta modalidade possa de fato ser utilizada de forma segura e ser amplamente difundida na prática odontológica diária.

Neste estudo foi levantada uma série de trabalhos científicos que relatam a eficiência da TFDA em culturas de bactérias orais em suspensões planctônicas e em biofilmes. Os primeiros relatos da utilização desta técnica na odontologia

foram realizados por Wilson, Harvey e Dobson¹⁰⁵ em 1992, que demonstraram, em culturas planctônicas, que a associação de alguns corantes, com comprimentos de onda monocromáticos, localizados na região visível do espectro eletromagnético e em regime de baixa intensidade de potencia, foram capazes de erradicar algumas espécies de bactérias orais.

Em 1993 Wilson et al.¹⁰⁶ demonstraram o sucesso do uso da TFDA em culturas planctônicas de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Neste trabalho os autores utilizaram um LASER de gás Hélio/Neônio que emitia um comprimento de onda de $660 \pm 5\text{nm}$, com irradiância de 7.3mW/cm^2 e um tempo de exposição de 80 segundos.

Outros trabalhos publicados, como os de Burns et al.^{12,11} em 1994 e em 1995, investigaram o potencial de descontaminação desta técnica em MO cariogênicos e periodontopatogênicos, utilizando fotossensibilizadores (FS) como o azul de metileno, azul de toluidina, alguns compostos baseados nas porfirinas e fontes de luz como os LASERs de baixa intensidade de potência e mais recentemente os sistemas baseados na tecnologia dos diodos emissores de luz (LED).

A análise da literatura pertinente permitiu observar que existe um grande número de trabalhos que investigam a ação da TFDA em MO em suspensões planctônicas e em biofilmes desorganizados, como é o caso dos trabalhos publicados por Wilson et al.¹⁰⁴ em 1995, e Zanin et al.⁹⁹ em 2002. Além disso, foi

possível ainda observar que são publicadas menores quantidades de trabalhos que estudam o efeito desta técnica em biofilmes maduros e organizados.

Em 2001 Mah, O'Toole⁵⁹ afirmam que é importante ter em mente que os resultados provenientes dos estudos realizados em suspensões de culturas planctônicas, não devem ser extrapolados para a condição clínica normal, uma vez que, os MO presentes na cavidade oral estão organizados em biofilmes maduros multiespécies que conferem a estes MO um aumento significativo na resistência frente aos agentes antimicrobianos.

Costerton et al.¹⁸ relacionam este aumento significativo na resistência dos MO com a presença da matriz polimérica extracelular (MPE), que está presente nos biofilmes orais, e que atua como uma barreira física impedindo o íntimo contato do FS com a parede celular dos MO. Ademais, outros pesquisadores acreditam ainda que esta resistência possa estar relacionada também, com a fase de crescimento^{24,28,29,32} em que estes MO se encontrem, ou seja, quanto maior for o metabolismo destas bactérias, maiores são as chances de que os FS penetrem no interior do citoplasma bacteriano.

Apesar dos poucos trabalhos publicados acerca da eficiência da TFDA em biofilmes dentais, e dos altos índices de resistência que os MO apresentam quando organizados em biofilme, existem relatos na literatura que suportam a ideia da realização da TFDA em biofilmes e, por exemplo, podem ser citados os trabalhos publicados por alguns pesquisadores, como O'Neill et al.⁷⁵ em 2002, que relatam altas taxas de sucesso da terapia utilizando corantes como o azul de metileno e o

azul de toluidina, quando irradiados com comprimentos de onda na faixa espectral do vermelho ($660\text{nm} \pm 5\text{nm}$).

Em 2008 Giusti et al.³⁹ avaliaram a eficiência da TFDA em lesões de cárie artificiais que foram induzidas em pastilhas de esmalte e dentina obtidas a partir de incisivos bovinos. Neste trabalho, os FS utilizados foram o azul de toluidina e o Photogem®, o comprimento de onda de eleição teve pico máximo de emissão em 660 nm, e este era emitido por um sistema de irradiação baseado na tecnologia dos LEDs. Os resultados obtidos claramente demonstraram que, as condições experimentais propostas pelos autores, foram capazes de promover a obtenção de altos índices de descontaminação do tecido dentinário bovino com o uso da TFDA.

A literatura que foi levantada no Capítulo 1, evidencia que se faz necessário a realização de trabalhos que investiguem o potencial antimicrobiano de novas drogas, fontes de luz e protocolos que embasem cientificamente a utilização desta terapia na rotina clínica diária. Neste sentido foi decidido estudar o potencial antimicrobiano que a TFDA apresenta utilizando FS como o Photogem®, a Hipericina e a Curcumina em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* – Capítulo 2 – e em biofilmes monoespécie de *Streptococcus mutans* – Capítulo 3.

Muito embora a literatura apresente grande quantidade de dados científicos que demonstrem uma maior suscetibilidade dos MO quando em suspensões planctônicas, poucos ou quase nenhum são os dados disponíveis relacionados com

a utilização dos fármacos Curcumina e Hipericina no controle de MO cariogênicos.

Assim sendo, o objetivo do Capítulo 2 desta tese, foi o de avaliar o potencial antimicrobiano dos FS Curcumina, Hipericina e hematoporfirina em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans*, que foram irradiados com auxílio de um equipamento protótipo – Biotable – que permite ao operador escolher uma entre as três opções de faixa espectral que estão disponíveis neste equipamento.

Os resultados obtidos neste capítulo claramente demonstraram que os protocolos aqui estudados, e que utilizaram como fotossensibilizadores os fármacos Photogem® e Hipericina, foram capazes de promover reduções microbiológicas significativas na contagem de colônias viáveis do MO *S. mutans*.

Estas reduções corresponderam a reduções de 6,8 (10 mg/L – 120 J/cm²) e 7 logs (1mg/L – 1 J/cm²) respectivamente, além disso, os protocolos que utilizaram maiores concentrações de Hipericina e maiores doses de energia promoveram a total erradicação dos MO estudados.

Estes achados estão de acordo com uma série de trabalhos da literatura, como por exemplo, os trabalhos de Paulino et al.⁷⁷ em 2005 e Bevilacqua et al.³ em 2007, que descreveram índices de redução microbiana similares aos encontrados neste trabalho.

Os protocolos experimentais aqui propostos, que utilizaram como agente fotossensibilizante a Curcumina, não foram capazes de promover a obtenção de qualquer nível de redução microbiana, o que pode sugerir em princípio que, o

fármaco utilizado apresenta baixos níveis de rendimento quântico, ou seja, nas condições experimentais propostas (concentração, tipo do fármaco e dose de energia), este pode não ter sido capaz de gerar grandes quantidades de oxigênio singleto.

Além disso, é possível que os pobres resultados observados estejam relacionados diretamente com as concentrações de Curcumina que foram testadas neste trabalho, ou seja, estas podem ter sido selecionadas em uma região abaixo do limiar de ação para esta droga. Nesta condição trabalho, acreditamos que a atuação desta droga dependa de uma relação probabilista que é estabelecida entre a quantidade de moléculas de fotossensibilizador e a população de bactérias do inóculo que ficam distribuídas em um dado volume.

Esta hipótese pode ser corroborada através do trabalho publicado por Dahl et al.²², que em 1989, investigaram a capacidade que o oxigênio singleto tem de oxidar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ao final deste estudo, os autores concluíram que este radical livre altamente reativo consegue oxidar as bactérias de ambas as classificações de coloração Gram e, além disso, os autores salientam que a associação do tempo de vida breve (da ordem de $0,04\mu\text{s}$) com a baixa capacidade de difusão que este radical livre apresenta, acabam por limitar significativamente a sua atuação.

Tendo em vista a hipótese probabilística sugerida nesta discussão, acreditamos que o tempo de contato (período de incubação pré-irradiação), que o agente fotossensibilizador é mantido em contato com o inóculo possa aumentar

significativamente a chance de encontro entre as moléculas do fármaco e os MO quando do momento em que a reação fotodinâmica aconteça. Nesta tese as amostras estudadas foram irradiadas imediatamente após o posicionamento do FS em contato com o inoculo de *Streptococcus mutans*.

A literatura descreve um aumento significativo na resistência dos MO quando estes estão organizados em biofilmes, em sua maioria, os relatos descrevem um aumento na resistência que variam de 10 até 1000^{19,32,72,81} vezes frente aos agentes antimicrobianos tradicionais. Em função desta literatura e dos resultados que foram obtidos no Capítulo 2, imagina-se que o estudo da viabilidade da TFDA em biofilmes de *Streptococcus mutans* – Capítulo 3 – utilizando os fármacos estudados anteriormente (Photogem®, Hipericina e Curcumina) deveria ser realizado apenas com os grupos que apresentaram os melhores resultados de inativação obtidos no estudo realizado em suspensões planctônicas.

Mas em função do pequeno número de trabalhos publicados na literatura que investigam o efeito desta terapia em biofilmes organizados, e motivados por poder contribuir com a literatura atual, com novas observações experimentais, foi decidido experimentar as mesmas condições anteriormente estudadas nos biofilmes maduros de *Streptococcus mutans*.

Neste sentido, o objetivo do Capítulo 3 desta tese, foi o de avaliar o potencial antimicrobiano obtido com o uso da TFDA que utilizou os FS

hematoporfirina, Hipericina e Curcumina na redução da contagem de MO viáveis de *S. mutans* em biofilmes maduros de quinze dias de crescimento.

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam que a TFDA nas condições de experimentação que aqui foram propostas, não foi capaz de apresentar resultados de redução microbiana que justifiquem o seu uso na clínica diária. No entanto, os resultados de inativação encontrados neste trabalho, demonstraram a obtenção de reduções significativas na contagem microbiológica de até 56% de redução para o grupo Photogem.

Estes resultados se apresentam em concordância com a maioria dos trabalhos publicados na literatura. Como exemplo, pode ser citado o trabalho publicado por Guglielmi et al.⁴¹ em 2009, que relatam a obtenção de taxas de redução de MO viáveis que variaram entre 70 e 80% com a utilização da TFDA.

Apesar dos resultados apresentados no Capítulo 3 serem consonantes com a literatura atual, os resultados aqui discutidos, apresentaram escores inferiores de redução microbiana quando estes são comparados aos resultados de trabalhos que foram publicados previamente na literatura. Acreditamos que este fato, esteja relacionado com a ausência da adoção de um período de incubação pré-irradiação das amostras estudadas, o que poderia, em tese, melhorar a penetração dos agentes fotossensibilizadores utilizados na estrutura que compõe o biofilme, e conseqüentemente poderia melhorar o efeito dos protocolos propostos de TFDA.

Nesta direção pode ser citado o trabalho de Zanin et al.¹⁰¹, que corrobora a nossa hipótese, ao propor um tempo de incubação pré-irradiação de 5 minutos.

Neste trabalho, os autores discutem que este período foi de fundamental importância para a obtenção de melhores resultados com a TFDA.

Ainda nesta direção, alguns autores, como Wainwright¹⁰² em 1997, comentam que pouco se conhece até o momento, a respeito da penetração dos agentes antimicrobianos e principalmente dos FS no interior do biofilme, além disso, estes ainda relatam que a solubilidade do FS em água é um fator crítico que influencia diretamente a penetração dos fármacos no biofilme.

Outros fatores, como tempo de maturação do biofilme, fase de crescimento em que se encontram os MO estudados, e os fatores de resistência que são expressos pelos MO contidos nas diferentes camadas que formam o biofilme dental bacteriano, podem também, ter influenciado os resultados obtidos neste trabalho. Estas hipóteses são suportadas por alguns trabalhos publicados na literatura, como por exemplo, o trabalho de Zanin et al.⁹⁹, que por meio da técnica de microscopia confocal a LASER, avaliou a eficiência da TFDA em profundidade.

As imagens obtidas nesse trabalho evidenciaram que o maior índice de dano bacteriano pode ser observado nas regiões mais superficiais que compunham os biofilmes estudados, além disso, os autores puderam também concluir que, os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis ao dano promovido pela TFDA quando comparados com os resultados obtidos para os biofilmes mais jovens.

7 CONCLUSÃO GERAL

A terapia fotodinâmica antimicrobiana que utiliza a Hipericina como fármaco é uma técnica terapêutica que pode ser aplicada na descontaminação bucal geral, uma vez que os protocolos estudados foram capazes de promover reduções similares ao grupo controle Clorexidina 2%, ou seja, esta terapia demonstrou efetividade para ser utilizada contra os microrganismo *Streptococcus mutans* que estejam presentes em suspensão na saliva. No entanto nenhum protocolo terapêutico estudado foi capaz de promover qualquer redução significativa em biofilmes de *Streptococcus mutans*.

7.1 TRABALHOS FUTUROS

Em função da realização dos trabalhos contidos nos Capítulos de 1 a 3 apresentados nesta tese, acreditamos que novos trabalhos deverão ser realizados de maneira a investigar mais profundamente:

- i) o efeito do período de incubação pré-irradiação na obtenção de melhores resultados de inativação microbiana;
- ii) a permeabilidade dos diferentes fotossensibilizadores disponíveis no biofilme dental bacteriano;
- iii) o efeito dos diferentes comportamentos eletrônicos sobre a atuação biológica dos agentes fotossensibilizadores disponíveis; e,
- iv) o efeito biológico que diferentes regimes de irradiação (pulsado ou contínuo) podem promover para a melhoria da TFDA.

8 REFERÊNCIAS *

1. Andrade AKM, Montes MAJR, Porto ICCM, Sales GCF, Braz R. Remoção da dentina cariada: abordagem atual. Rev Gaucha Odontol. 2008; 56: 175-80.
2. Axellson P. Development and diagnosis of carious lesions. In: Axellson P. Diagnosis and risc prediction of dental caries. Chicago: Quintessence; 2000. Cap. 5, p. 179-247.
3. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a Planktonic Culture. Photomed Laser Surg. 2007; 25: 513-8.
4. Bhatti M, Macrobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of Toluidine blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. Photochem Photobiol. 1998; 68: 370-6.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: [http://](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

5. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res.* 1997; 31: 411-7
6. Bowden G, Edwardson S. Ecologia oral e a cárie dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia clínica*. São Paulo Ed. Santos; 1995. p.45- 62.
7. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res.* 1998; 32: 456-62.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
9. Briskin DP, Leroy A, Gawienowski MC. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's Wort. *Plant Physiol Biochem.* 2000; 38: 413-20.
10. Burnett Jr LH, Conceição, EN. Doença cárie: manifestações clínicas, diagnóstico e terapêutica. In: Conceição EN. *Dentística: saúde e estética*. Porto Alegre: Artmed; 2000. p. 25-36.
11. Burnett GW, Scherp HW, Schuster GS. *Microbiologia oral e doenças infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1978.

12. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitization of cariogenic bacteria to Killing by light from a helium-neon laser. *J Med.Microbiol.* 1993; 38: 41-5.
13. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994; 22: 273-8.
14. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1995; 29: 192-7.
15. Carvalho VCM. Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrolíticas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer [Dissertação de mestrado]. São Carlos: Instituto de Química da USP; 2001.
16. Cellorova E, Daxnerova Z, Kimakova K, Haluskova J. The variability of the hipericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum* L. *Acta Biotechnol.* 1994; 14: 267-74.
17. Consolaro A. Cárie dentária – histopatologia e correlação clínica e radiográfica. Bauru: Consolaro Editora; 1996.
18. Consolaro A, Pereira AAC. Histopatologia da cárie dentária e correlações clínicoradiográficas. *CECADE News.* 1994; 2: 11-22.
19. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-22.

20. Cristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*.1987; 8: 423-6.
21. Curtis JD, Lersten NR. Internal secretory structures in *Hypericum perforatum* Linné and *H. balearicum* L. *New Phytol*. 1990; 144: 571-80.
22. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol*. 1989; 171: 2188-94.
23. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*.1989; 151: 183-5.
24. De Menezes PFC. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. [Tese de Doutorado]. São Carlos: Instituto de Química da USP; 2006.
25. Desai M, Büler T, Weller PH, Brown MRW. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 153-60.
26. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. *Arch Oral Biol*.1992; 37: 883-7.
27. Dougherty TJ. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem Photobiol*. 1987; 46: 569-73.

28. Dougherty T J, Kaufman J E, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978; 38: 2628.
29. Duguid IG, Evans E, Brown MRW, Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 30: 803-10.
30. Duguid IG, Evans E, Brown MRW, Gilbert P. Growth- rate independent killing by ciprofloxacin of biofilm derived *Staphylococcus epidermidis*: evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 30: 791-802
31. Dumsha T, Hovland E. Considerations and treatment of direct and indirect pulp-capping. *Dent Clin North Am.* 1985; 29: 251-9.
32. Eidelman E, Finn SB, Koulourides T. Remineralization of carious dentin treated with calcium hydroxide. *J Dent Child.* 1965; 32: 218-25.
33. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 27: 177-84.
34. Evans RC, Holmes CJ. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31: 889-94.

35. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4: 63-70.
36. Fusayama T. *New Concepts in operative dentistry.* Chicago: Quintessence; 1980. p. 14-59.
37. Fusayama T, Terashima S. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. *Bull Med Dent Univ. Tokyo.* 1972; 19: 83-92.
38. Geourgakoudi I, Nichols MG, Foster TH. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photocem Photobiol.* 1997; 65: 135-44.
39. Giusti JSM. Avaliação da terapia fotodinâmica utilizando diodo emissor de luz (LED) na descontaminação de dentina bovina artificialmente cariada [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.
40. Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al.. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 281-7.
41. Gollnick K. Type II photosensitized oxygenation reactions. *Adv Photochem.* 1968; 67: 78-101.
42. Guglielmi CAB. Avaliação microbiológica in vivo de lesões de cárie profundas tratadas pela terapia fotodinâmica. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

43. Hamilton IR, Bowden GH. Oral microbiology. In: Lederberg J, editor. *Encyclopedia of microbiology*. San Diego: Academic Press; 2000.
44. Iost HI, Costa JH, Rodrigues HH. Dureza e contaminação bacteriana após a remoção da lesão de cárie. *Rev ABO Nac.* 1995; 3: 25-9.
45. Ivanov AV, Reshetnicov AV, Ponomarev GV. One more PDT application of Chlorin e6. *SPIE.* 2000; 3909: 131-7.
46. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2007; 6: 1234-45.
47. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960; 1: 304-20.
48. Kessel D, Chang CK, Musselman B. Chemical, biologic and biophysical studies on 'hematoporphyrin derivative'. *Adv Exp Med Biol.* 1985; 193: 213-27.
49. Kidd EAM. How 'clean' must be a cavity before restoration? *Caries Res.* 2004; 38: 305-13.
50. Kordic A, Lussi A, Luder HU. Performance of visual inspection, electrical conductance and laser fluorescence in detecting occlusal caries in vitro. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003; 113: 852-9.

51. Kuboki T, Liu CF, Fusayama, T. Mechanism of differential staining in carious dentin. *J Dent Res.* 1983; 62: 713-4.
52. Kuboki T, Ohgushi k, Fusayama T. Collagen biochemistry of the layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1977; 56: 12-33.
53. Legler DW, Menaker L. Definição, etiologia, epidemiologia e implicações clínicas da cárie dentária. In: Menaker L, Morhart RE, Navia MJ, editores. *Cáries dentárias – bases biológicas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1984. p. 186-9.
54. Lennon AM, Buschalla W, Switalski L, Stookey GK. Residual caries detection using visible fluorescence. *Caries Res.* 2002; 36: 315-9.
55. Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer.* 1967; 20: 2255-7.
56. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Res.* 1976; 9: 65-107.
57. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 353-80.
58. Loesche WJ. *Cárie dental: uma infecção tratável.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1993.

59. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of Streptococcus mutants with human dental decay. *Infect Immun.* 1975; 11: 1252-60.
60. Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 34-9.
61. Maltz M, Henz S, Oliveira EF. A microbiological study of conventional and incomplete dentine caries removal. *Caries Res.* 2004; 38: 367.
62. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int.* 2002; 33: 151-9.
63. Marinho VA, Pereira GM. Cárie: diagnóstico e tratamento. *Rev Univ Alfenas.* 1998; 4: 27-37.
64. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8: 263-71.
65. Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res.* 1997; 11: 176-85.
66. Mertz-Fairhurst EJ, Curtis Jr JW, Ergle JW, Rueggberg FA, Adair SM. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc.* 1998; 129: 55-66.

67. Miller WA. Layering in dentin caries as demonstrated by localization of dyes [Thesis]. Illinois: College of Dentistry of the University of Illinois; 1959.
68. Miller WA, Massler M. Permeability and staining of active and arrested carious lesions in dentine. *Brit Dent J.* 1962; 112: 187-97.
69. Mjör IA. Microscopic changes in dentin. *Ala Dent Rev.* 1960; 8: 16-21.
70. Miyauchi H, Iwaku M, Fusayama T. Physiological recalcification of carious dentine. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 1978; 25: 169-79.
71. Newbrun E. Histopatologia da cárie dentária. In: Newbrun E, editor. *Cariologia.* 2 ed. São Paulo: Editora Santos; 1988. p. 231-54, 326.
72. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 27: 619–24.
73. Ohgushi K. Collagen fibers in two layers of carious dentin. I. Histochemical study. *J Jap Stom Soc.* 1973; 40: 65-74.
74. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975; 54: 1019-26.
75. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M: Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidina blue. *Lasers Surg.* 2002; 31: 86-90.

76. Pardi V, Mialhe FL, Pereira AC, Meneghim MC. Avaliação in vitro do aparelho DIAGNOdent® para diagnóstico oclusal in vitro. *Pesqui Odontol Bras.* 2000; 14: 372-7.
77. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 353-9.
78. Pinelli C, Serra MC, Lofredo LD. Validity and reproducibility of a laser fluorescence system for detecting the activity of white-spot lesions on free smooth surfaces in vivo. *Caries Res.* 2002; 36: 19-24.
79. Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining. *J Dent Res.* 1976; 55: 678-83.
80. Pinheiro IVA, Carvalho GM, Alves MSCF, Lima KC. Reprodutibilidade do laser DIAGNOdent®, na avaliação do conteúdo mineral da dentina. *Cienc Odontol Bras.* 2003; 6: 79-85.
81. Policard. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumikre de Wood. *C R Soc Bid.* 1924; 91: 1423-8.
82. Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31: 1502-6.
83. Pulga FG. Estudo clínico comparativo entre o uso dos lasers e métodos convencionais de diagnóstico e tratamento em dentes decíduos na presença

- de lesão cariiosa [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.
84. Richter AM, Jain AK, Obochi M, Meadows H, Canaan H, Levy JG. Activation of benzoporphyrin derivative in circulation of mice without photosensitivity. *Photochem. Photobiol.* 1994; 59: 350.
85. Roos G. Caries Diagnosis with DIAGNOdent® laser: a users product evaluation. *Ont Dent.* 1999; 76: 21-4.
86. Schey KL, Patat S, Chignell CF, Datillo M, Wang RH, Roberts JE. Photooxidation of lens alpha-crystallin by hypericin (active ingredient in St. John's wort). *Photochem Photobiol.* 2000; 72: 200-3.
87. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369: 51-9.
88. Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Manson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent® for quantification of smooth surface caries: an in vitro study. *Caries Res.* 2001; 35: 21-6.
89. Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Manson B. Validation of DIAGNOdent® for quantification of smooth-surface caries: an in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 74-8.
90. Smetana Z, Mendelson E, Manor J, van Lier E, Ben Hur E, Salzberg S, et al. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. *J Photochem. Photobiol.* 1994; B 22: 37.

91. Southwell IA, Bourke CA. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum*. L. *Biochem Syst Ecol.* 2000; 56: 437-41.
92. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 905-11.
93. Thystrup A , Fejerskov O. *Tratado de cariologia.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988.
94. Thystrup A, Qvist V. Principal enamel and dentine reactions, during caries progression. In: Thystrup A, Leach AS, Qvist V, editors. *Enamel and dentine reactions in the oral cavity.* Oxford: IRL; 1987.
95. Tonnesen HH, de Vries HD, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987; 76: 371-3.
96. Vaarkamp J, Ten Bosch JJ, Verdonschot EH, Bronkhorst. The real performance of bitewing radiography and fiber-optic transillumination in approximal caries diagnosis. *J Dent Res.* 2000; 79: 1747-51.
97. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73: 672-81.
98. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Arch Klin Med.* 1904; 80: 427-87.

99. Zanin ICJ. Estudo da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2005.
100. Zanin ICJ, Brugnera Junior A, Höfling JF, Zanin FAA, Gonçalves RB. Antimicrobial effect of low-level laser therapy in the presence of photosensitizer on human saliva bacteria. *Las Dent III*. 2002; 3: 162-9.
101. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemoter*. 2005; 56: 324-30.
102. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemoter*. 1998; 42: 13-28.
103. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997; 19: 75-80.
104. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrobial Chemoter*. 1996; 37: 377-81.
105. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*. 1992; 25: 77-81.

106. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of *Streptococcus sanguinis* to killing by low-power laser light. *Lasers Med Sci.* 1993; 8: 69-73.
107. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by lowpower laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995; 5: 569-74.
108. Weyne S. Cariologia. In: Baratieti LN. *Dentística - Procedimentos preventivos e restauradores.* Rio de Janeiro: Quintessence; 1989. p. 1-42.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 24 de fevereiro de 2012.

FERNANDO LUIS ESTEBAN FLOREZ