



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



**JUÇAÍRA STELLA MARTINS GIUSTI**

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO DIODO  
EMISSOR DE LUZ (LED) NA DESCONTAMINAÇÃO DE DENTINA  
BOVINA ARTIFICIALMENTE CARIADA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Ciências Odontológicas – Área  
Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia  
de Araraquara, da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para  
obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Profa. Adjunto Lourdes dos Santos-Pinto**

**Araraquara  
2005**

JUÇAÍRA STELLA MARTINS GIUSTI

**Avaliação da terapia fotodinâmica utilizando diodo emissor de luz  
(LED) na descontaminação de dentina bovina artificialmente  
cariada**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR**

**PRESIDENTE:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lourdes dos Santos-Pinto

**2<sup>o</sup> EXAMINADOR:** Prof Dr Vanderlei Salvador Bagnato

**3<sup>o</sup> EXAMINADOR:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Kurachi

**4<sup>o</sup> EXAMINADOR:** Prof Dr Fábio César Braga de Abreu e Lima

**5<sup>o</sup> EXAMINADOR:** Prof Dr Antonio Carlos Pizzolitto

Araraquara, 09 de dezembro de 2005

## **DADOS CURRICULARES**

### **JUÇAÍRA STELLA MARTINS GIUSTI**

**Nascimento:** 29 de maio de 1965 – São Carlos – SP

**Filiação:** Osvaldo Gonçalves Martins

Edna Stella Martins

**1984-1987:** Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

**1993-1994:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Especialização em Odontopediatria – EAP-APCD- Regional Araraquara

**2000-2002:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, área de Odontopediatria – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

**2002-2005:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, na área de Odontopediatria – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

**1997-2001:** Professora do Curso de Especialização em Odontopediatria da EAP–APCD regional São Carlos

**2000-....:** Professora do Curso de Especialização em Odontopediatria da EAP–APCD regional Araraquara

*A Deus*, por me dar a vida, a capacidade, a força de vontade e a oportunidade de encontrar todas as pessoas que me ajudaram a realizar este trabalho.

*Aos meus pais*, Edna e Osvaldo, pelo exemplo de retidão, perseverança e humildade além do apoio entusiasta e confiança sempre presentes durante toda minha vida.

*Ao meu marido*, André Luiz, pelo incentivo, apoio, paciência, tolerância e amor incondicional, sempre presente nos momentos mais difíceis.

*Aos meus filhos*, André e Lorenzo, pela luz e alegria com que preenchem minha vida, sempre oferecendo amor e carinho em troca da minha ausência.

**A VOCÊS DEDICO ESTE TRABALHO**

### *Agradecimentos especiais*

***Tuka***, não posso transformar em palavras a minha gratidão por tê-la tido como orientadora. Falo não só pela profissional dedicada, segura e competente que é mas, principalmente pelo ser humano que me compreendeu, animou, esclareceu e incentivou em todos os momentos. Que Deus a abençoe e ilumine sempre para que outras pessoas possam passar pela experiência por que passei e tê-la como mestra e amiga.

***Vanderlei***, foi muito importante para mim além do conhecimento formal, poder receber o exemplo de determinação, de fé, trabalho incansável, a busca pela perfeição e o desafio constante de avançar sempre rumo ao desconhecido. Muito obrigada por me aceitar como aprendiz e prossiga sempre abrindo portas para aqueles que o procuram.

### *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara – UNESP, na pessoa de sua diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, seu Vice-Diretor, Prof.Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP: Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria aparecida Giro, Fábio César de Abreu Lima, Josimeri Hebling Costa e Ângela Cristina Cilense Zuanon, pela atenção e carinho a mim dedicados.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, coordenadora do curso de Pós-graduação, pela competência e dedicação à frente da coordenação do curso, visando sempre o melhor aproveitamento e desempenho de todos.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, da Disciplina de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, por seu entusiasmo e boa vontade em passar adiante os valiosos conhecimentos adquiridos ao longo de sua carreira.

À Profa.Dra. Cristina Kurachi, Responsável pelo Laboratório de Biofotônica do IFSC- USP, por sua presteza e dedicação, quando tudo parecia que não ia dar certo.

À LÍlian Tan Moriyma, mestranda em Física aplicada do Laboratório de Biofotônica do IFSC – USP, por sua ilimitada paciência em dirigir meus passos entre números, gráficos e fórmulas.

Ao Eurico de Carvalho Filho, graduando do curso de Engenharia Física da UFSCAR e estagiário do Laboratório de Biofotônica do IFSC-USP, por seu entusiasmo e inteligência perspicaz, sempre pronto a me ajudar a desvendar os mistérios dos gráficos e funções.

À Profa. Dra. Rosane de Fátima Zaniratto Lizarelli, pesquisadora do Laboratório de Biofotônica do IFSC, pela competência e alegria com que desenvolve seu trabalho, contagiando a todos.

À Maria do Carmo Dória Martins, funcionária do Laboratório de Microbiologia clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pelo carinho e atenção que sempre me concedeu e pela colaboração e eficiência nos trabalhos de laboratório, permitindo a concretização dessa obra

À Profa. Dra. Flávia Maria Costa e Carvalho Konishi, pelo apoio e incentivo incondicionais durante esta minha caminhada.

Às minhas companheiras na carreira docente, Profa. Elina Mara Silva Marcomini, Profa. Karina Dela Coleta Pizol e Profa Maristela Cayetano, pela compreensão e amizade que sempre demonstraram.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Célia, Cristina, Dulce, Odete, Pedro, Regina, Silvia, Sônia, Tânia e Toninho, pela atenção e carinho que sempre me dedicaram.

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

Às Funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Física da USP – São Carlos, Maria Neusa A. Azevedo e Ana Mara M C. Prado, pela atenção e dedicação em me atender sempre.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e, em especial aos da Seção de Pós-Graduação, Mara, Rosângela, Vera e Silvia, pela paciência e disposição com que sempre me atenderam.

Às Secretárias do Grupo de Óptica do IFSC- USP Isabel e Benê, pela atenção e disposição com que sempre me receberam.

Aos colegas da Pós-Graduação, “irmãos de orientação”, Fábio, Cristiane e Luciana, pelos momentos de companheirismo dessa caminhada.

À amiga e colega de Pós-Graduação, Paula, pelos momentos de alegria, tristeza, comemoração, decepção, compreensão, determinação, aflição, enfim, pela



oportunidade de convivermos e crescermos juntas nesta árdua caminhada. Foi muito gratificante.

A todos os companheiros do Laboratório de Biofotônica: Adalberto, Ângelo, Alessandra, Augusto, Clóvis, Daniel, Denis, Dirceu, Emery, Fábio, Fernando, Juliana, Mardoqueu e Vitória pela colaboração, companheirismo e carinho em todos os momentos.

Às minhas irmãs Janaína e Maria Júlia, ao meu Irmão Osvaldo, aos meus sogros Edson e Neuda e aos meus cunhados e cunhadas: Ana Paula, Eduardo E. e Eduardo R., Junior, Bel, Marcelo e Socorro, pelo incentivo e torcida constantes.

À minha avó Maria, que acompanha de perto minha vida desde meu nascimento, ajudando, apoiando e torcendo sempre.

À CAPES, pelo apoio financeiro

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente da minha formação e da realização deste trabalho, peço a Deus que os abençoe proteja.

## SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIACÕES .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Efetividade do Photogem<sup>®</sup> ativado por LED na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Efetividade do TBO ativado por LED na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Incorporação de Photogem<sup>®</sup> e TBO em dentina bovina sadia e cariada .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE - Metodologia ilustrada.....</b>	<b>100</b>

## *Prefácio*

Esta tese foi dividida em três capítulos que correspondem a três artigos científicos intitulados:

1) Efetividade do Photogem<sup>®</sup> ativado por LED na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente.

Submetido para publicação no periódico Lasers Physics

2) Efetividade do TBO ativado por LED na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente.

Submetido para publicação no periódico Lasers in Surgery and Medicine

3) Avaliação da incorporação do Photogem<sup>®</sup> e do TBO em dentina bovina sadia e cariada artificialmente.

Submetido para publicação no periódico Caries Research.

## ***Abreviações:***

BHI- Brain-heart infusion (infusão de cérebro-coração)

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados

D- dose de luz

FDA – Food and Drug Administration

FS – Fração de sobrevivência

I - intensidade de luz

J – Joule

LED – Light emission diode (diodos emissores de luz)

mW – mili Watts

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nm- nanômetros

PDT – Photodynamic Therapy (Terapia fotodinâmica)

TBO - Toluidine blue O (orto azul de toluidina)

UFC – unidades formadoras de colônias

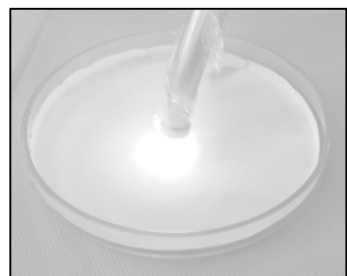
---

---

# INTRODUÇÃO

---

---



## ***Introdução***

O conceito da terapia fotodinâmica (PDT, Photodynamic Therapy) foi introduzido por Oscar Raab em 1900 e a era moderna da PDT iniciou-se na década de 1960 com os estudos de Lipson et al.<sup>21</sup>, que observaram fluorescência em lesões neoplásicas induzida por injeção de hematoporfirina em estado natural com conseqüente melhor observação das mesmas durante as cirurgias. Desde então muito tem sido estudado para entender a eficácia e os mecanismos desse processo.<sup>11,16,20,23,24</sup>

A técnica da terapia fotodinâmica usa a propriedade de seletividade da luz *laser* e emprega uma droga fotossensibilizadora (aquela que torna o meio onde se encontra sensível à ação da luz) que é administrada por via endovenosa, oral ou tópica no caso de pacientes oncológicos. A droga percorre todo corpo, sendo absorvida por todas as células. As células sadias eliminam grande quantidade dessa droga em um período que varia de 24 a 36 horas, enquanto as células tumorais, por apresentarem metabolismo diferenciado, retêm essa droga por um tempo mais prolongado. Assim, 24 horas após a administração da droga, a substância fotossensibilizadora estará mais concentrada nas células neoplásicas, estabelecendo uma diferenciação entre essas células e as demais. Esta substância fotossensibilizadora é excitada quando iluminada por uma luz de cor específica e uma vez neste estado energético, provoca uma reação química com o oxigênio molecular, produzindo uma espécie eletrônica de oxigênio (o estado singlete),

altamente reativa para os constituintes celulares e, portanto, bastante citotóxica. Como consequência, a célula neoplásica e o tecido tumoral como um todo são levados à necrose, eliminando a lesão.<sup>1,23,30</sup>

A primeira droga fotossensibilizadora aprovada em tratamento de alguns tipos de tumores foi o Photofrin<sup>®</sup>, uma mistura de porfirinas oligômeras.<sup>10</sup> Novas gerações de drogas estão sendo estudadas, não apenas em tratamento de tumores, como também em outras aplicações nas áreas da oftalmologia,<sup>17</sup> cardiologia,<sup>43</sup> dermatologia,<sup>7</sup> odontologia,<sup>5,26,32,37,41</sup> imunologia<sup>31</sup> e hematologia.<sup>2</sup> Devido ao fato de ainda não existir um consenso na utilização dos corantes para PDT na descontaminação de tecido cariado, neste trabalho, optamos por utilizar dois tipos diferentes de fotossensibilizadores: O Photogem<sup>®</sup>, um medicamento de origem russa equivalente ao Photofrin, produzido nos EUA e amplamente utilizado na PDT em pacientes oncológicos, e o TBO (azul de toluidina O), que é um corante básico bastante utilizado em experimentos com bactérias bucais.<sup>3,7,25,27,29,30,36,38,39,41</sup>

Atualmente, o *laser* é a fonte de luz mais empregada para ativar os fotossensibilizadores. Devido às propriedades que o mesmo apresenta: concentração elevada de energia, pouca dispersão de energia à medida que a luz se propaga, coerência e monocromaticidade, é possível iluminar um meio composto por materiais diversos e só interagir com um determinado componente. A essa característica do *laser* damos o nome de seletividade e ela ocorre devido à propriedade da monocromaticidade, que nos permite selecionar a cor do *laser* de

tal forma que a luz só interaja com uma determinada molécula, dentro de um universo de várias moléculas.

Porém, com o desenvolvimento dos LED (diodos emissores de luz), começaram a surgir os primeiros estudos que utilizam esta tecnologia aplicada à terapia fotodinâmica.<sup>22,33,36</sup> Tanto o *laser* como o LED produzem irradiação num comprimento de onda específico, porém a irradiação LED é emitida numa faixa mais ampla do espectro eletromagnético, não é coerente e colimada como ocorre com a irradiação *laser*. Com o surgimento desses estudos que verificaram a eficácia do LED e ao comparar seu uso ao do *laser*, constatou-se que os aparelhos emissores de LED têm um custo muito menor. Espera-se, com isso, que possa haver uma popularização dessa técnica.

Estudos da década de 1990 mostravam que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas, era susceptível a essa terapia.<sup>6,9,25,29,32,43</sup> Assim sendo, adaptou-se a utilização de uma técnica empregada a pacientes oncológicos para combater bactérias orais, surgindo daí o interesse em desenvolver um método de descontaminação da dentina cariada, baseado na terapia fotodinâmica.

A técnica da PDT pode oferecer diversas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana é rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos de tempo como no caso do uso de antibióticos e anti-sépticos. Em segundo lugar, como a morte das bactérias não está ligada à mediação de radicais químicos, o desenvolvimento de resistência seria



improvável. Como nem o fotossensibilizador nem a luz empregada são bactericidas quando utilizados isoladamente, a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada e evitando-se a destruição da microbiota em outros locais.<sup>5,40,42</sup>

Por essa razão, a PDT pode ser uma alternativa interessante a antibióticos e anti-sépticos utilizados como coadjuvantes de métodos mecânicos de controle de biofilme, subgingival e supra gengival, e também um método de descontaminação bacteriana do tecido dental cariado.

Segundo Consolaro,<sup>8</sup> (1996) podemos distinguir clinicamente dois tipos de dentina comprometida no sentido da superfície para a polpa. A dentina infectada, caracterizada por consistência mole e cor amarelada, contendo  $10^8$  bactérias/g, predominantemente proteolíticas. Nesta dentina podemos distinguir uma zona necrótica, desorganizada, amolecida e praticamente amorfa e uma outra região, mais profundamente localizada em relação à necrótica, correspondente à zona de dentina desmineralizada superficial, caracterizada pela deformação da morfologia canicular e manutenção da matriz orgânica. Esse tipo de dentina não pode ser remineralizada. Abaixo da dentina infectada encontramos a dentina contaminada, que se mostra com estrutura distorcida, mas com textura parcialmente mantida, assemelhando-se à do couro, contendo  $10^5$  bactérias/g, correspondendo a 0,1% das bactérias da zona infectada, sendo predominantemente acidogênicas e, devido à sua considerável preservação estrutural, pode ser considerada remineralizável. Na dentina contaminada podem distinguir-se, da superfície para a polpa, três regiões: zona de dentina desmineralizada profunda

(localizada logo abaixo da zona de desmineralização superficial), uma de esclerose dentinária e, freqüentemente, a dentina reacional; juntas, elas constituem a zona de dentina hipermineralizada. A diferença entre a dentina desmineralizada profunda e a dentina hígida, basicamente se estabelece pela perda de minerais; macroscopicamente, esta dentina se apresenta seca e coriácia.

O aspecto cor, isoladamente, bem como a consistência da dentina, não são capazes de diferenciar o estágio de desenvolvimento da lesão de cárie e tampouco a existência de bactérias remanescentes em tecido firme.<sup>4,18,19</sup> Por essa razão, devido à grande dificuldade de identificar clinicamente o estágio de comprometimento da dentina, é de fundamental importância que o tecido remanescente não contenha microrganismos suficientes para desencadear a reativação do processo, para permitir ao tecido que se repare.<sup>15</sup>

Não podemos deixar de considerar, também, que durante as últimas décadas observamos o declínio da prevalência da doença cárie, atribuído ao sucesso da prevenção de cáries primárias. Porém, as lesões de cárie secundárias continuam sendo as maiores causas de falha e reposição das restaurações. Assim sendo, a eliminação ou redução desses microrganismos no tecido dentário remanescente constitui um artifício importante para minimizar esse problema.

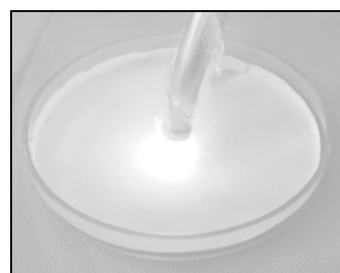
---

---

# PROPOSIÇÃO

---

---



## ***Proposição***

### **Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi verificar a efetividade da PDT na desinfecção do tecido dental cariado, utilizando o LED como fonte emissora de luz.

### **Objetivos Específicos**

1) A efetividade do Photogem<sup>®</sup> (em diferentes concentrações) como agente fotossensibilizador, ativado por diferentes doses de energia produzida pelo LED na efetividade da terapia fotodinâmica para redução bacteriana em tecido artificialmente cariado.

2) A efetividade do TBO (em diferentes concentrações) como agente fotossensibilizador ativado por diferentes doses de energia produzida pelo LED na efetividade da terapia fotodinâmica para redução bacteriana em tecido artificialmente cariado.

3) Incorporação de Photogem<sup>®</sup> e TBO em dentina bovina sadia e cariada artificialmente.

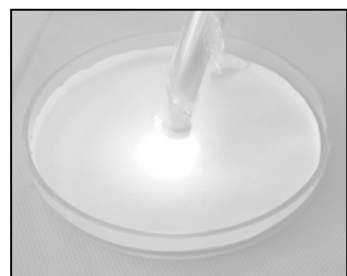
---

---

# CAPÍTULO 1

---

---



**Efetividade do Photogem® ativado por LED na descontaminação  
de dentina bovina cariada artificialmente**

**GIUSTI, Juçaira S.M. \***

**SANTOS-PINTO, Lourdes \*\***

**PIZZOLITTO, Antonio Carlos \*\*\***

**KURACHI, Cristina\*\*\*\***

**BAGNATO, Vanderlei S. \*\*\*\*\***

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Lourdes Santos-Pinto

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903 Araraquara – SP, Brasil

Fax: 55- 16- 3301-6330

\* Mestre em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

\*\* Prof. Adjunto do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

\*\*\* Prof. Dr. do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

\*\*\*\*Doutora em Ciência e Engenharia dos Materiais pelo Instituto de Física de São Carlos- USP

\*\*\*\*\*Prof. Titular do Departamento de Física e Ciência dos Materiais do Instituto de Física de São Carlos – USP

## ***Resumo***

O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente, utilizando o Photogem<sup>®</sup> como agente fotossensibilizador e um diodo emissor de luz (LED) como fonte ativadora. Para este fim, foram obtidos, a partir de incisivos bovinos, espécimes em dentina que foram imersos em um meio de cultura estéril, acrescidos de *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>8</sup> UFC e *Streptococcus mutans* 10<sup>8</sup> UFC. Em seguida, os espécimes foram submetidos a diferentes concentrações de fotossensibilizador : PA= 1mg/mL, PB= 2 mg/mL e PC= 3 mg/mL e diferentes doses de luz, 60s (D= 24 J/ cm<sup>2</sup>) e 120s (D= 48 J/ cm<sup>2</sup>) de aplicação. A análise estatística do resultado constituído pelo número das UFC por miligrama de dentina cariada, evidenciou que o uso do LED associado ao fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup> foi efetivo na redução bacteriana em dentina bovina cariada artificialmente, sendo o melhor efeito promovido pela aplicação do Photogem<sup>®</sup> 2 mg/mL e 24 J/cm<sup>2</sup> de dose de luz (Fração de sobrevivência = 0,14). Quanto maior a concentração do fotossensibilizador, maior sua toxicidade na ausência de luz e maior sua interferência na observação do efeito da luz, quando aplicada.

***Palavras-chave:*** Fotoquimioterapia; dentina; luz; laser; bactéria

### ***Abstract***

The aim of this study was the evaluation of the effectiveness of photodynamic therapy in the decontamination of artificial carious bovine dentin, using Photogem<sup>®</sup> as a photosensitizer agent and a LED based emission light as an activating source. Dentin samples obtained from bovine incisors were immersed in sterile broth plus *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>8</sup> CFU and *Streptococcus mutans* 10<sup>8</sup> CFU. Different concentrations of photosensitizer: PA= 1mg/mL, PB= 2 mg/mL and PC= 3 mg/mL and two light doses, 60 seconds of application (D= 24 J/ cm<sup>2</sup>) and 120 seconds (D= 48 J/cm<sup>2</sup>) were applied on the specimens. After CFU counting per milligram of carious dentin and data statistical analysis, we observed that the use of LED associated to the photosensitizer (Photogem<sup>®</sup>) was effective in bacterial reduction count in artificially carious bovine dentin. The best effect was obtained with the application of Photogem<sup>®</sup> 2 mg/ ml and 24 J/cm<sup>2</sup> of light dose (survival fraction = 0.14) and, the photosensitizer toxicity increased in the absence of light.

**Key-words:** Photochemotherapy; dentin; LED; photosensitizer; light; lethal photosensitization; bacteria.



## ***Introdução***

Devido ao grande avanço na prevenção da cárie primária nas últimas décadas, temos assistido a um declínio da ocorrência da doença. No entanto, a cárie secundária continua sendo a maior causa de falhas e substituição de restaurações. Uma das grandes dificuldades durante a remoção do tecido cariado é o reconhecimento visual e tátil da dentina desorganizada, sem potencial reparador e a determinação dos limites para remoção deste tecido.<sup>2,11,12,23</sup>

As técnicas atualmente empregadas para remoção da lesão de cárie não são seletivas e utilizam evidências subjetivas para determinar a quantidade do tecido dentário a ser removido. Assim, a avaliação da cor e da consistência da dentina não são suficientes para garantir que o tecido dentário remanescente esteja com um número de microrganismos suficiente para evitar um processo de recidiva de cárie.<sup>5,9,11,12,19</sup>

Na tentativa de reduzir o número de microrganismos presentes na dentina cariada remanescente após a realização do preparo cavitário, tem sido indicada a aplicação de substâncias tais como a clorexidina e o NaOCl<sup>8,21,22,25</sup>. Recentemente, estudos têm apontado a terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy–PDT) como um possível método para descontaminação do tecido cariado remanescente.<sup>4,6,17,29,30,31</sup>

A técnica da terapia fotodinâmica baseia-se na ativação de um agente fotossensibilizador pela luz, o que resulta em efeito citotóxico. Inicialmente foi desenvolvida para o uso em pacientes com lesões oncológicas superficiais. As

células tumorais foram capazes de reter um agente fotossensibilizador injetado por via endovenosa que quando irradiado pela luz *laser* com comprimento de onda específico, na região do tumor, provocava a necrose do tecido, eliminando a lesão.<sup>7,10</sup>

O início do emprego da técnica da terapia fotodinâmica para combater microrganismos na cavidade bucal ocorreu na década de 1990, na qual trabalhos realizados com microrganismos em suspensão comprovaram sua seletividade, ou seja, sua ação ocorria apenas em áreas onde o agente fotossensibilizador e a luz estivessem presentes.<sup>4,6,17,29,30,31,32</sup>

Como a maioria dos estudos que comprovaram a ação bactericida da terapia fotodinâmica foi realizada utilizando-se bactérias em suspensão, optamos por aplicar esta técnica diretamente sobre a dentina bovina cariada, procurando dessa forma, reproduzir, da melhor maneira possível, as condições clínicas da cárie dentária.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente, utilizando-se o Photogem<sup>®</sup> como agente fotossensibilizador e variando-se a dose de luz aplicada.

### ***Material e Método***

Para a realização deste estudo foram utilizados nove incisivos bovinos, sem anomalias estruturais visíveis a olho nu. Os dentes, após serem limpos por meio de raspagem do tecido periodontal, tiveram o esmalte da face

vestibular da coroa removido por meio de uma ponta diamantada tronco-cônica (FG 1036G- KG Sorensen do Brasil), montada em alta-rotação. Em seguida, com uma broca trefina de titânio (2,7 mm de diâmetro interno, Impladonto – São Paulo, Brasil) montada em baixa rotação, foram obtidos, de cada dente, 4 fragmentos de dentina. Um dos fragmentos serviu como controle e os três restantes foram distribuídos para as diferentes condições experimentais. Cada fragmento foi seco com ar comprimido durante 60s e pesado em uma balança (Marte AL500, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, São Paulo – Brasil), identificado e armazenado em água destilada até o início do experimento.

Os espécimes foram autoclavados por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C e, após a esterilização, cada um foi transferido para um tubo de cultura identificado contendo 2 mL de suspensão indutora de cárie. Esta suspensão foi preparada com uma infusão de cérebro-coração modificada (BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedo 0,5 g/100 mL, glicose 1g/100 mL e sacarose P.A . 2g /100 mL) e a cada 50 mL dessa suspensão foram acrescentados 5 mL de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC#ITAL-523) - 10<sup>8</sup> UFC e 5 mL de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) - 10<sup>8</sup> UFC, com o intuito de promover o crescimento bacteriano. Os tubos contendo os espécimes foram mantidos a 37<sup>0</sup>C, em microaerofilia, por 14 dias, sendo a suspensão trocada a cada 48 horas. Decorrido esse período, os espécimes foram mantidos sob refrigeração a 4<sup>0</sup>C, com a finalidade de paralisar a multiplicação bacteriana, até o momento do tratamento.

Os espécimes do grupo controle não receberam qualquer tipo de tratamento e foram transferidos diretamente do meio de cultura para outros tubos

contendo 5 mL de solução salina para realização da análise da presença de bactérias pelo método de diluições sucessivas para contagem das UFC.

Nos grupos experimentais, o fotossensibilizador aplicado foi o Photogem<sup>®</sup>, uma mistura de monômeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina, em três diferentes concentrações: PA= 1mg/mL, PB= 2 mg/mL e PC= 3 mg/mL durante 60 s, ficando protegido da luz com a finalidade de evitar a fotoativação pela luz ambiente. A fonte de luz utilizada para a ativação do fotossensibilizador foi um protótipo com 2 LED vermelhos de luxeon, com uma banda de emissão centrada em 630nm, diâmetro da ponta 0,8 cm (área de 0,5 cm<sup>2</sup>), intensidade de 400 mW/cm<sup>2</sup> e potência de 200 mW. Foram utilizados dois tempos diferentes de aplicação: 60s (D= 24 J/ cm<sup>2</sup> ) e 120s (D= 48 J/ cm<sup>2</sup> ).

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

Dose de Luz em J/cm <sup>2</sup>	Tempo de Aplicação (s)	Concentração do Fotosensibilizador		
		1 mg/mL	2mg/mL	3mg/mL
-	0	P A	P B	P C
24	60	P A 60	P B 60	P C 60
48	120	P A 120	P B 120	P C 120

Os espécimes dos grupos experimentais após o tratamento, foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina e agitados em Vortex (Heidolph, 60 Hz, Germany) por 60s. Desta suspensão foram retirados 0,5 mL e transferidos para tubos de cultura contendo 4,5 mL de solução salina, segundo o método das diluições sucessivas. Foram feitas duas diluições e plaqueados 0,1 mL de cada uma destas em placas de Petri contendo BHI

modificado acrescido de Ágar e seguindo-se incubação das placas a 37<sup>0</sup>C por 48 horas, em jarras de microaerofilia. Foram realizadas três repetições para cada condição experimental. Após a incubação, o cálculo da presença de bactérias nos espécimes foi feito através da contagem de colônias em contador digital (Gallenkamp, Inglaterra) e dividiu-se o número de unidades formadoras de colônia pelo peso de cada amostra, obtendo-se assim a quantidade de UFC por miligrama de dentina cariada. Detalhes da descrição da metodologia utilizada estão apresentados nas figuras 1 a 7 e 11 a 16 do apêndice (Capítulos 1 e 2). Para a padronização dos valores com relação ao grupo controle, a quantidade de UFC obtida nos espécimes do grupo controle, foi dada como contaminação máxima (100%) e os valores de UFC obtidos nos grupos experimentais foram transformados segundo sua proporção com relação ao seu controle. Como os dados não apresentaram uma distribuição normal, foi realizada a transformação em logaritmo para a aplicação do teste estatístico de análise de variância ( $p \leq 0,05$ ) a dois critérios fixos e completada a análise com o teste de comparação múltipla de Tukey. Para complementar a análise dos resultados, determinou-se a variação da Fração de Sobrevivência (FS) para diferentes concentrações de Photogem<sup>®</sup>, doses de luz e suas interações. Foi elaborada uma expressão empírica que relaciona a FS com a concentração e a dose de luz utilizada, considerando como primeiro passo, a variação da FS na ausência de luz. Assim, para esse regime, determinou-se que:

$$\begin{array}{l} C \longrightarrow 0 \longrightarrow FS = 1 \\ C \longrightarrow \infty \longrightarrow FS = 0 \end{array}$$

Onde C= concentração do fotossensibilizador

Resultando numa expressão do tipo :  $FS(D = 0) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0}}$  Onde D= dose de luz  
 C é expressa em mg/mL  
 $C_0 \sim 1\text{mg/mL}$

A presença da luz faz com que o efeito tóxico da droga seja amplificado. Assim, à medida que se aumentou a dose de luz, deve-se ter aumentado a toxicidade e, portanto, chegou-se a seguinte expressão:

$$FS(D, C) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

### Resultado

O Gráfico 1 evidencia que o primeiro tratamento utilizado, Photogem<sup>®</sup> 1mg/mL sem aplicação de luz (PA) apresentou maiores valores para a Fração de Sobrevivência (FS), ou seja, maior proporção de UFC sobreviventes por miligrama de dentina cariada e, os demais grupos não seguiam um padrão de aumento ou diminuição das proporções.

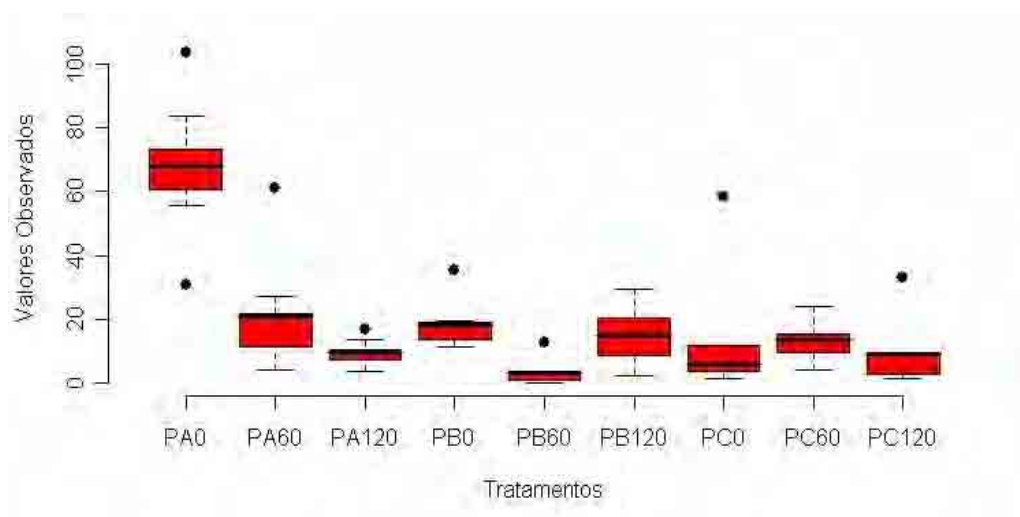


GRÁFICO 1 - Dispersão dos dados observados para o corante Photogem<sup>®</sup> nas diferentes concentrações e doses de luz utilizada.

A aplicação da análise de variância aos dados obtidos (Tabela 1), evidenciou que a interação entre os fatores foi estatisticamente significativa. Desta forma, a análise dos fatores individualmente foi excluída e procedeu-se à análise da interação utilizando o método de Comparações Múltiplas de Tukey descrito na Tabela 2.

Tabela 1 -Análise de Variância aplicada aos valores de UFC obtidos nos grupos tratados e controle

<b>Análise de Variância – ANOVA</b>					
<b>Componentes</b>	<b>GL</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Valor F</b>	<b>p valor</b>
<b>Modelo</b>	8	46,82829338	5,85353667	13,99	<,0001*
<b>Concentração</b>	2	14,04692028	7,02346014	16,78	<,0001*
<b>Irradiação</b>	2	11,15556560	5,57778280	13,33	<,0001*
<b>Concentração*Irradiação</b>	4	21,62580750	5,40645188	12,92	<,0001*
<b>Erro</b>	72	30,13433486	0,41853243		
<b>Total</b>	80	76,96262824			

\* significância estatística

Tabela 2 - Comparações Múltiplas de Tukey

<b>Grupos de Tukey</b>	<b>Média do logaritmo das Respostas</b>	<b>Número das Médias</b>
A	4,18771750	1
B	2,90425614	4
B	2,87567778	2
B	2,61322830	6
B	2,55407809	8
B	2,27277917	3
C	2,05102637	7
C	1,99647033	9
C	1,26188034	5

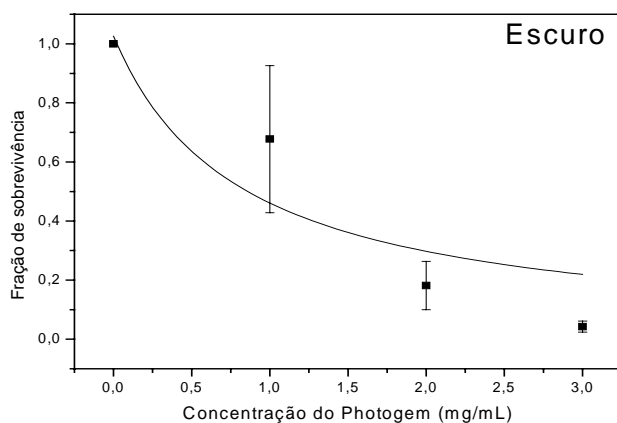
Médias com mesmas letras são não significativamente diferentes

O grupo que apresentou a maior média de UFC por miligrama de dentina cariada, foi o tratado com Photogem<sup>®</sup> na concentração 1mg/mL e ausência de luz (PA). Observamos, também, que existe uma combinação dos dois fatores que minimiza a resposta, ou seja, a redução da proporção de UFC por miligrama de dentina cariada com relação ao grupo controle. Essa combinação é dada pelo fator Concentração (Photogem<sup>®</sup> 2 mg/mL) e pelo fator Irradiação (60s), que representa neste caso uma dose equivalente a  $24 \text{ J/cm}^2$  (Tabela 2) .

Analisando os resultados da expressão:

$$FS(D, C) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

observamos que as concentrações de fotossensibilizador utilizadas produziram efeito tóxico em diferentes níveis na ausência de luz (Gráfico 2).



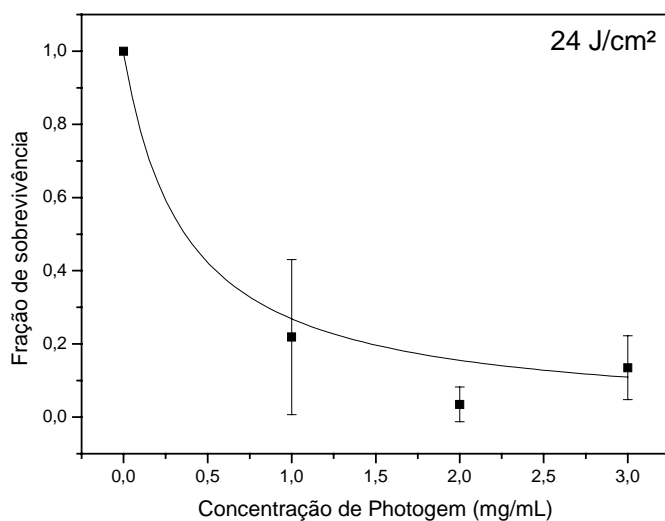
$$y = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

onde  
 $D_0=24 \text{ J/cm}^2$ ,  
 $D=0 \text{ J/cm}^2$  e  
 $C_0=1 \text{ mg/mL}$

GRÁFICO 2 - FS em relação à concentração de Photogem<sup>®</sup> sem aplicação de luz.

Com a aplicação de uma dose de luz de  $24 \text{ J/cm}^2$ , pudemos observar uma redução na FS, comparado ao grupo onde a luz não foi aplicada (Gráfico 3).



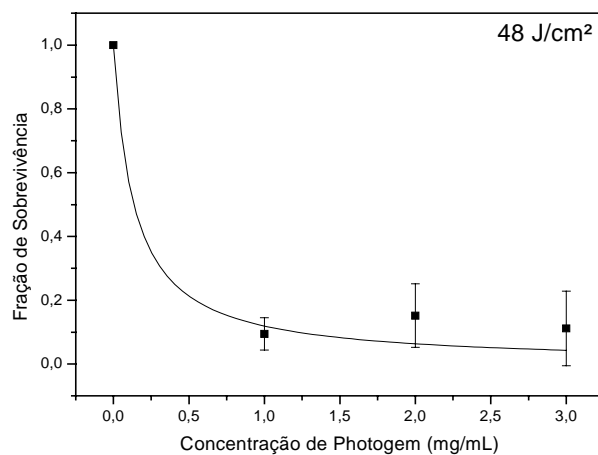


$$y = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

onde  
 $D_0=24 \text{ J/cm}^2$ ,  
 $D=24 \text{ J/cm}^2$  e  
 $C_0=1 \text{ mg/mL}$

GRÁFICO 3 - FS em relação à Concentração de Photogem<sup>®</sup> quando é aplicada uma dose de 24J/ cm<sup>2</sup> de luz

E, quando aplicamos uma dose de luz de 48 J/cm<sup>2</sup>, observamos uma tendência de redução da FS (Gráfico 4), com as mesmas concentrações de fotossensibilizador.



$$y = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

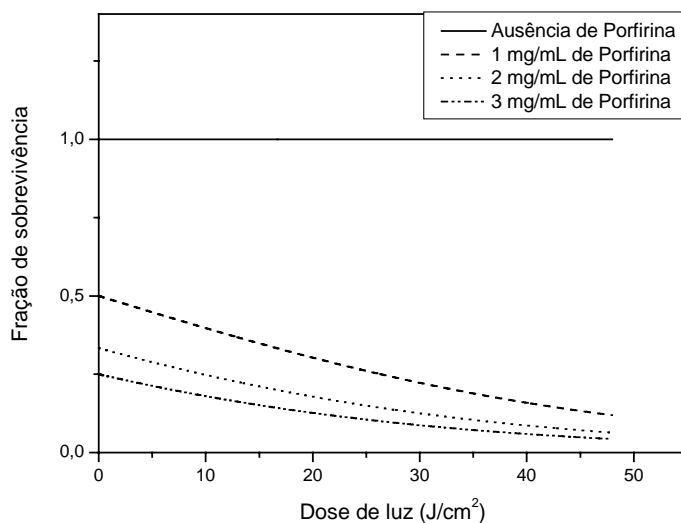
onde  
 $D_0=24 \text{ J/cm}^2$ ,  
 $D=48 \text{ J/cm}^2$  e  
 $C_0=1 \text{ mg/mL}$

GRÁFICO 4 - FS em relação à Concentração de Photogem<sup>®</sup>, quando é aplicada uma dose de 48J/ cm<sup>2</sup> de luz.

Ainda baseados na expressão proposta, pudemos construir um gráfico de FS em função da dose de luz, através do qual foi possível calcular a FS de acordo com a concentração do fotossensibilizador e a dose de luz empregada. Este

gráfico, evidenciou que, quanto maior a concentração de Photogem<sup>®</sup>, menor a dose de luz necessária para eliminar a mesma quantidade de microrganismos.

Gráfico 5.



$$y = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

onde  
 $D_0 = 24 \text{ J/cm}^2$   
 $C_0 = 1 \text{ mg/mL}$

GRÁFICO 5 - FS em relação à dose de luz, na presença de diferentes concentrações de Photogem<sup>®</sup>.

Com essa expressão podemos definir também a chamada região de segurança, determinando os parâmetros de D (dose) e C (concentração) FS < 90%, 95% e 99 %, ou seja, a relação entre a dose de luz e a concentração de fotossensibilizador capaz de eliminar entre 90 e 99% dos microrganismos presentes. Gráfico 6.

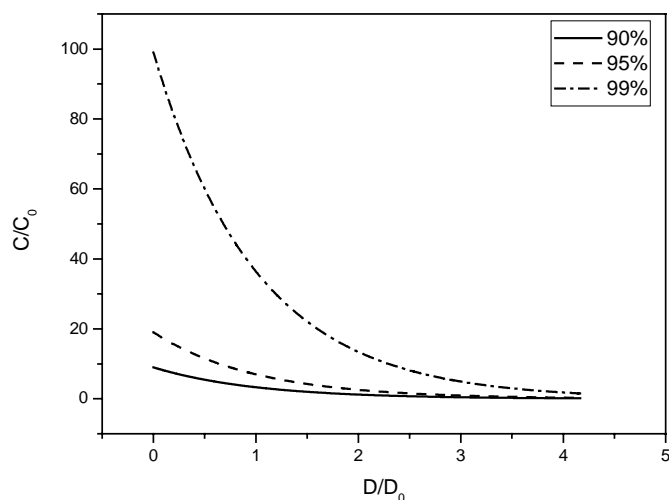


GRÁFICO 6 - correlação entre as razões de concentração de fotossensibilizador e dose de luz para eliminação de microrganismos.

### ***Discussão***

A utilização de um procedimento clínico capaz de reduzir bactérias presentes no tecido cariado infectado, dando a este tecido capacidade de remineralização, possibilitaria a preservação de uma maior quantidade de tecido dentário durante a remoção da lesão de cárie.

A aplicação da técnica da PDT na erradicação de microrganismos, tem sido amplamente estudada, com resultados que demonstraram sua eficácia na eliminação de microrganismos da cavidade bucal, quando estão em suspensão.<sup>4,6,17,27,29,30,32</sup> Estudos mais recentes comprovaram sua eficácia na eliminação de microrganismos na presença de biofilme, de uma matriz de colágeno ou dentina.<sup>3,28,33</sup>

No presente estudo, optou-se por realizar a técnica da PDT em microrganismos aderidos à dentina bovina artificialmente cariada, procurando simular com maior fidelidade a sua aplicação clínica.

A fonte de luz empregada nos estudos iniciais de PDT foi o *laser*, porém recentemente, começaram a surgir os primeiros estudos utilizando LED como fontes emissoras de luz para a realização da técnica da PDT em medicina.<sup>13,20</sup> O primeiro trabalho avaliando o efeito do Azul de Toluidina O (TBO), como fotossensibilizador, associado tanto com o *laser* de HeNe como com o LED, na destruição de *Streptococcus mutans* em biofilme,<sup>33</sup> utilizou doses entre 49 e 294 J/cm<sup>2</sup> e mostrou que ambas as fontes de luz foram efetivas na redução da viabilidade de *S. mutans*.

Uma das principais vantagens da utilização de uma fonte de luz à base de LED, é o seu custo mais acessível, além da praticidade por ser um aparelho compacto, seguro, fácil de usar e com capacidade para irradiar grandes áreas. O dispositivo utilizado no presente estudo, possui uma ponta ativa de 0,8 cm de diâmetro, suficiente para irradiar cavidades extensas em uma única aplicação.

Os fotossensibilizadores são compostos que absorvem energia de uma luz de um determinado comprimento de onda e são capazes de utilizar essa energia para induzir reações em outras moléculas.<sup>18</sup> Uma grande variedade de fotossensibilizadores também vem sendo estudada, e para que os mesmos possam produzir um efeito antimicrobiano, é necessário que apresentem picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz usada para sua ativação. Vários estudos, entre eles o realizado por Venezia,<sup>24</sup> (1985) já demonstrava que derivados de hematoporfirina possuíam efeito bactericida sobre *S. mutans* e outros microrganismos<sup>1,14,16</sup>. Associado a esse fato, os derivados de hematoporfirina foram as primeiras substâncias a receberem a autorização da

FDA para o uso clínico na terapia fotodinâmica. Seu efeito citotóxico é mediado principalmente pela produção de oxigênio singlete, sendo um evento oxigênio dependente. As bactérias gram-negativas parecem ser mais refratárias à sua utilização, provavelmente devido à complexidade de sua parede celular.<sup>15,26</sup>

Neste estudo, pudemos observar que a citotoxicidade do Photogem<sup>®</sup> na ausência da luz, aumenta com o aumento da sua concentração, e, que, em concentrações muito elevadas, não é possível verificar o efeito do aumento da dose de luz.

Os gráficos 2,3 e 4 descrevem a toxicidade do Photogem<sup>®</sup> no escuro e sua fototoxicidade com a ativação pela luz nas doses de 24 J/cm<sup>2</sup> e 48 J/cm<sup>2</sup>. Observamos que, as concentrações utilizadas foram tóxicas no escuro em diferentes níveis, e que à medida que a dose de luz aumentava, havia uma redução na FS. Malik et al.<sup>14</sup> (1990) e Dobson e Wilson<sup>6</sup> (1992), utilizando hematoporfirina 0,005% e um *laser* de HeNe de 7,3 mW de potência e dose de 5,5 J/cm<sup>2</sup> não obtiveram bons resultados na destruição de microrganismos gram-negativos. Porém, Wilson et al.<sup>31</sup> (1993) observaram fotossensibilização letal de *P. gingivalis* com hematoporfirina, estando os microrganismos não em biofilme, mas em suspensão. Nossos resultados evidenciaram que as concentrações de fotossensibilizadores, combinadas com as doses de luz empregadas, produziram efeito bactericida.

O Photogem<sup>®</sup> na concentração 3 mg/mL tem um efeito de toxicidade no escuro muito elevado, o que dificulta a observação de sua interação com a luz, ou seja, em concentrações menores como 2 mg/mL e 1 mg/mL (principalmente),

a toxicidade no escuro é menor, e, à medida que a dose de luz aumenta, o fator de sobrevivência é consideravelmente reduzido (Gráfico 5).

A função que nos possibilitou o cálculo da dose de luz e concentração de fotossensibilizador necessárias para alcançarmos 90%, 95% e 99% de morte bacteriana, nos mostrou que altas concentrações de fotossensibilizador são capazes de eliminar os microrganismos com doses baixas de luz, porém, doses mais elevadas de luz também são capazes de eliminar microrganismos com concentrações mais baixas de fotossensibilizador. Por meio dessa função, podemos definir a meta a ser alcançada em relação à porcentagem de morte bacteriana, e ajustarmos a concentração de fotossensibilizador e a dose de luz, de acordo com as fontes de luz e corantes disponíveis a fim de obtermos o efeito desejado (Gráfico 6).

O método de comparações múltiplas de Tukey demonstrou que a maior redução do número de microrganismos foi obtida no grupo do Photogem<sup>®</sup> 2mg/mL e dose de luz de 24 J/cm<sup>2</sup> (tempo de irradiação 60s). Os outros tratamentos são considerados estatisticamente iguais e produziram redução significativa no número de microrganismos; no entanto, no grupo PC ( Photogem<sup>®</sup> 3 mg/mL) a citotoxicidade da porfirina no escuro foi tão intensa, que não foi possível observar o efeito da dose de luz nesse grupo

Em 2003, Williams et al<sup>27</sup> observaram 100% de morte de *Streptococcus mutans* em suspensão planctônica, utilizando como fonte emissora, de luz um *laser* diodo de 633 +- 2nm e energia variando entre 0,4 – 4,8 J e o TBO como fotossensibilizador. Em 2004, os mesmos autores,<sup>28</sup> utilizando a mesma

fonte de luz, com energias variando entre 1,8 a 14,4 J. e o mesmo fotossensibilizador na concentração 10µg/mL, observaram uma redução no efeito bactericida da PDT em *Streptococcus mutans* presentes em matriz de colágeno e dentina humana cariada. A presença do biofilme e da dentina propriamente dita, afetam negativamente a eficiência da técnica, pois o sucesso da mesma depende da difusão do corante e da absorção da luz para que o maior número possível de microrganismos seja atingido.

Assim, nossos estudos evidenciaram que, o uso do LED associado ao Photogem,<sup>®</sup> foi efetivo na redução bacteriana em dentina bovina cariada artificialmente e que o Photogem<sup>®</sup> na concentração de 2 mg/mL e associado à uma dose de irradiação de 24 J/ cm<sup>2</sup> (PB60), apresentou a maior eficiência na redução da viabilidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, e quanto maior a concentração do fotossensibilizador, maior a toxicidade na ausência de luz.

### **Referências**

1. BERTOLINI, G.; BENEDETTO, S.; DALL'ACQUA, M.; VAZZOLER, M.; JORI, G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 39, n.6, p. 811-816, June,1984.
2. BJORNDAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res.**, Basel, v. 31, n.6, p.411-417, 1997.
3. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 29, n.3, p.192-197, 1995.
4. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 38, n.6, p. 401-405, June. 1993.
5. CONSOLARO, A. **Cárie Dentária** : histopatologia e correlação clínica e radiográfica. Bauru: Consolaro Editora, 1996.
6. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 37, n. 11, p.883-887, Nov. 1992.
7. DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R.; WEISHAUP, K.R.; BOYLE, D.G. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 55, n.1, p.115-119, July 1975.



8. FRANCO, C.F.; PATARO, A.L.; E SOUZA, L.C.; SANTOS, V.R.; CORTES, M.E.; SINISTERRA, R.D. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. **Artif. Organs**, Cleveland, v. 27, n. 5, p. 486-491, May 2003.
9. GONZÁLES-CABEZAS, C.; LI, Y.; NOBLITT, T. W.; GREGORY, R.L.; KAFRAWY, A.H.; STOOKEY, G.K. Detection of *Mutans Streptococci* in secondary carious lesions using immunofluorescent techniques and confocal laser scanning microscopy. **Caries Res.**, Basel, v. 29, n.3, p. 198-203, 1995.
10. GRANELLI, S.G.; DIAMOND, I.; McDONAGH, A. F.; WILSON, C.B.; NIELSEN, S.L. Photochemiotherapy of glioma cells by visible light and hematoporphyrin. **Cancer Res.**, Chicago, v. 35, n.9, p. 2567-2570, Sept. 1975.
11. KIDD, E.A.M.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Microbiological evaluation of caries cavity during preparation. **Caries Res.**, Basel, v. 27, n.5, p. 402-408, 1993.
12. KIDD, E.A.M.; RICKETTS, D.N.J.; BEIGHTON, D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: a clinical and microbiological study. **Br. Dent. J.**, London, v. 180, n.8, p. 287-291, Apr. 1996.
13. LUI, H.; HOOBS, L.; TOPE, W.D.; LEE, P.K.; ELMETS, C.; PROVOST, N.; CHAN, A .; HEYNDORFF, H.; SU, X.Y.; JAIN, H.; HAMZAVI, I.; McLEAN, D.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and light-emitting diodes. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.140, n.1, p.26-32, Jan. 2004.
14. MALIK, Z.; JUDITH, H.; NITZAN, Y. New trends in photobiology (invited review) bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative

- approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B.Biol.**, Lausanne, v.5, n.3-4, p. 281-293, May 1990.
15. 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. Biol.**, Lausanne, v.32, n.3, p. 153-157, Feb. 1996.
16. NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 55, n.1, p. 89-96, Jan. 1992.
17. OKAMOTO, H.; IWASE, T., MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 12, n.4, p. 450-458, 1992.
18. SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 869-880, Aug. 2000.
19. SPLIETH, C.; ROSIN, M.; GELLISSEN, B. Determination of residual dentine caries after conventional mechanical and chemomechanical caries removal with Carisolv. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v.5, n.4, p. 250-253, Dec. 2001.
20. TSAI, J.C.; CHIANG, C.P.; CHEN, H.M.; HUANG, S.B.; WANG, C.W.; LEE, M.I.; HSU, Y.C.; CHEN, C.T.; TSAI, T. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 34, n 1., p.18-24, 2004.

21. VAHDATY, A.; PITT FORD, T.R.; WILSON, R.F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 9, n.6, p. 243-248, Dec. 1993.
22. VAN DIJKEN, J.W. The effect of cavity pretreatment procedures on dentin bonding: a four-year clinical evaluation. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 64, n.2, p. 148-152, Aug.1990.
23. VAN TRIJP, A.J.P.; VAN STEENBERGEN, T.J.M.; DE GRAAFF, J.; TEN CATE, J.M. Bactericidal colonization and degradation of dematerialized dentin matrix in situ. **Caries Res.**, Basel, v. 28,n. 1 , p.21-27, 1994.
24. VENEZIO, F.R.; DIVINCENZO, C.; SHERMAN, R.; REICHMAN, M.; ORIGINANO, T.C.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O.H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 151, n. 1, p.166-169, Jan.1985.
25. VIEIRA, R. S.; SILVA JR., I.A. Bond strength to primary tooth dentin following disinfection with a chlorhexidine solution: an in vitro study. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 25, n. 1, p. 49-52, Jan/Feb. 2003.
26. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.42, n.1, p.13-18, Jul.1998.
27. WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 37,n. 3 , p.190-193, May/Jun. 2003.

28. WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The photactivated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v. 38,n. 6 , p.530-536, Nov./Dec. 2004.
29. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, London, v. 44, n.2, p. 181-189, Apr. 1994.
30. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 75, n.4, p. 299- 306, Oct. 1993.
31. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, n.5, p.569-574, May 1995.
32. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 8, n.3, p.182-187, June 1993.
33. ZANIN, I.C.; GONÇALVES, R.B.; JUNIOR, A.B.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.56, n.2, p.324-330, Aug.2005.

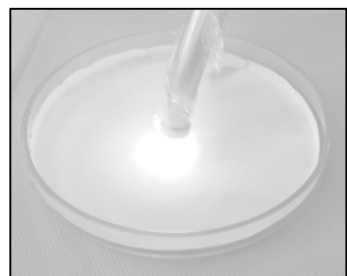
---

---

# CAPÍTULO 2

---

---



**Efetividade do TBO ativado por LED na descontaminação de dentina  
bovina cariada artificialmente**

**GIUSTI, Juçaira S.M. \***  
**SANTOS-PINTO, Lourdes \*\***  
**PIZZOLITTO, Antonio Carlos \*\*\***  
**CARVALHO FILHO, Eurico\*\*\*\***  
**BAGNATO, Vanderlei S. \*\*\*\*\***

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Lourdes Santos-Pinto

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903 Araraquara – SP, Brasil

Fax: 55- 16- 3301-6330

\* Mestre em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araraquara -

UNESP

\*\* Prof. Adjunto do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de

Odontologia de Araraquara – UNESP

\*\*\* Prof. Dr. do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

\*\*\*\*Graduando em Engenharia Física da Universidade Federal de São Carlos

-UFSCar

\*\*\*\*\*Prof. Titular do Departamento de Física e Ciência dos Materiais do

Instituto de Física de São Carlos - USP

### ***Resumo***

O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica na descontaminação de dentina bovina cariada artificialmente, utilizando o Azul de toluidina O (TBO) como agente fotossensibilizador e um emissor de luz à base de LED como fonte ativadora. Foi desenvolvida cárie artificial em fragmentos de dentina de incisivos bovinos, na presença de *Lactobacillus acidophilus* -  $10^8$  UFC e *Streptococcus mutans* -  $10^8$ UFC. Esses fragmentos foram embebidos em solução fotossensibilizadora de TBO nas concentrações de 0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL por 60s e expostos a diferentes doses de luz, 60s de aplicação ( $D= 24 \text{ J/cm}^2$ ) e 120s ( $D= 48 \text{ J/cm}^2$ ). Após a contagem das UFC por miligrama de dentina cariada, pode-se observar que o uso do LED associado ao fotossensibilizador TBO foi eficaz na descontaminação da dentina bovina artificialmente cariada, sendo a maior redução bacteriana obtida com a aplicação do TBO 0,1 mg/mL e  $48 \text{ J/cm}^2$  de dose de luz (tempo de aplicação 120s) que não houve uma interação entre concentração do fotossensibilizador e dose de luz aplicada.

***Palavras-chave:*** Fotoquimioterapia; dentina; luz; laser; bactéria

### ***Abstract***

The aim of this study was the evaluation of the photodynamic therapy effect on the decontamination of artificial caries in bovine dentin; using toluidine blue O (TBO) as photosensitizer agent and a LED light as activating source. Artificial caries was developed on fragments of bovine dentin in the presence of *Lactobacillus acidophilus*- $10^8$  CFU and *Streptococcus mutans*- $10^8$  CFU. The fragments were immersed in the TBO photosensitizer solution of 0.025 mg/mL and 0.1 mg/mL concentrations for 60s and exposed to different light dose, 60s ( $D= 24 \text{ J/ cm}^2$ ) and 120s ( $D= 48 \text{ J/ cm}^2$ ) application time. After CFU counting per mg of carious dentin, it was observed that the LED associated to TBO photosensitizer was efficient on bacterial reduction in artificial carious bovine dentin, being the best effect promoted by the application of 0.1 mg/mL TBO and  $48 \text{ J/cm}^2$  of light dose (application time = 120s) and, there was no interaction between the photosensitizer concentration and light dose applied.

***Key-words:*** Photodynamic therapy; tooth; LED; photosensitizer; light; lethal photosensitization, bacteria, light emitting diodes.



## ***Introdução***

A técnica da terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) é uma modalidade terapêutica relativamente nova no tratamento de lesões neoplásicas e não neoplásicas, que envolve a ativação de certos corantes (fotossensibilizadores) por luz, na presença de oxigênio tecidual, resultando em espécies reativas capazes de induzir à inviabilização das células.<sup>1,8,12</sup>

Atualmente o *laser* é a fonte de luz mais empregada para a ativação dos fotossensibilizadores, porém, com o desenvolvimento dos LED (diodos emissores de luz) surgiram os primeiros estudos que utilizam esta fonte de luz aplicada à terapia fotodinâmica.<sup>6,7,14,15</sup>

A luz produzida pelos LED possui características ligeiramente diferentes da luz *laser*, pois trata-se de uma emissão espontânea, policromática (numa faixa estreita), não coerente, sem aquecimento e com um certo espalhamento. Os aparelhos emissores de luz à base de LED, têm um custo muito menor que o dos aparelhos *laser*, tecnologia de produção mais simples e, além disso, podem cobrir uma área extensa de irradiação conjugando-se vários LED em uma mesma ponta. Desse modo, o emprego do LED na terapia fotodinâmica pode reduzir os custos da sua realização, favorecendo o emprego da mesma por um maior número de profissionais.

Estudos da década de 1990, utilizando principalmente o Azul de Toluidina O (Toluidine Blue O – TBO) como agente fotossensibilizador, evidenciaram que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas são susceptíveis a essa terapia.<sup>3,4,9,11,13,21</sup>

A destruição de bactérias por essa técnica, pode apresentar diversas vantagens em relação à utilização de agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana é rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de antibióticos e anti-sépticos. Em segundo lugar, como a morte bacteriana não está ligada à mediação de radicais químicos, o desenvolvimento da resistência seria improvável. Finalmente, como nem o fotossensibilizador, nem a luz empregada são bactericidas quando utilizados isoladamente, a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada, evitando a destruição da microbiota em outros locais.<sup>2,17,20</sup>

A utilização de fontes de luz à base de LED para ativar fotossensibilizadores com a finalidade de eliminar microrganismos da cavidade bucal ainda é pouco estudada.<sup>21</sup> Assim, foi objetivo deste estudo, avaliar a efetividade do TBO, ativado por LED na descontaminação bacteriana em dentina bovina cariada artificialmente.

### ***Material e Método***

Foram utilizados seis incisivos bovinos, que foram limpos por meio de raspagem do tecido periodontal e não apresentavam anomalias estruturais visíveis a olho nu. O esmalte da face vestibular da coroa foi removido por meio de uma fresa diamantada cônico-invertida (FG 1036G- KG Sorensen do Brasil), montada em alta-rotação e quatro fragmentos foram obtidos desta superfície, utilizando-se de uma broca trefina de titânio (2,7 mm de diâmetro interno, Impladonto - São

Paulo, Brasil), montada em baixa rotação. Um dos fragmentos serviu como controle e os outros três foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais. Cada fragmento, após a identificação, foi seco com ar comprimido durante 60s e pesado em uma balança (Marte AL500, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, São Paulo – Brasil). Em seguida, foram armazenados em água destilada até o momento do início do experimento.

Os espécimes foram autoclavados por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C e na seqüência, cada um foi transferido para um tubo de cultura identificado, contendo 2 mL de suspensão indutora de cárie preparada com uma infusão de cérebro-coração modificada (BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedo 0,5 g/100 mL, glicose 1g/100 mL e sacarose P.A . 2g /100 mL) e a cada 50 mL dessa suspensão, foram acrescentados 5 mL de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC#ITAL-523) - 10<sup>8</sup> UFC e 5 mL de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) - 10<sup>8</sup> UFC, com o intuito de promover a colonização bacteriana. Os tubos contendo os espécimes foram mantidos a 37<sup>0</sup>C, em microaerofilia, por 14 dias, sendo a suspensão trocada a cada 48 horas. Decorrido esse período, os espécimes foram mantidos sob refrigeração a 4<sup>0</sup>C, com a finalidade de paralisar a multiplicação bacteriana, até o momento do tratamento.

O fotossensibilizador utilizado foi o Azul de Toluidina O (Toluidine Blue O, C.I.52040), produzido pela Aldrich<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha); é um corante básico cujo grupamento cromóforo é catiônico e que se combina com grupamentos aniônicos das moléculas celulares (DNA e RNA) e foi utilizado em duas diferentes concentrações: TBO A= 0,025

mg/mL e TBO B= 0,1mg/mL, durante 60s, ficando protegido da luz com a finalidade de evitar a fotoativação pela luz ambiente.

A fonte de luz utilizada para a ativação do fotossensibilizador foi um protótipo à base de LED vermelho com 2 LED de luxeon, com uma banda de emissão centrada em 630nm, diâmetro da ponta 0,8 cm (área de 0,5 cm<sup>2</sup>) e intensidade de 400 mW/cm<sup>2</sup> e potência de 200 mW (Figura 12). Foram utilizados dois tempos diferentes de aplicação: 60s (D= 24 J/ cm<sup>2</sup>) e 120s (D= 48 J/ cm<sup>2</sup>).

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

Dose de Luz em J/cm <sup>2</sup>	Tempo de Aplicação (s)	Concentração do Fotosensibilizador	
		0,025 mg/mL	0,1 mg/mL
-	0	TBO A	TBO B
24	60	TBO A 60	TBO B 60
48	120	TBO A 120	TBO B 120

No grupo controle não se aplicou nenhum tipo de tratamento e seus espécimes foram transferidos diretamente do meio de cultura para outro tubo contendo 5 mL de solução salina para realização do método de diluições sucessivas para contagem das UFC. Foram realizadas três repetições para cada situação.

Após o tratamento, os espécimes dos grupos experimentais foram colocados em tubos de cultura contendo 5 mL de solução salina e agitados em Vortex (Heidolph, 60 Hz, Germany) por 60s. Desta suspensão, 0,5 mL foram transferidos para tubos de cultura contendo 4,5 mL de solução salina, para

determinação das UFC, segundo o método das diluições sucessivas. Foram feitas duas diluições e plaqueadas 0,1 mL de cada suspensão em placas de Petri contendo BHI modificado, acrescido de ágar sendo as placas incubadas a 37<sup>0</sup>C por 48 horas, em jarras de microaerofilia.

Posteriormente à incubação, procedeu-se à contagem de colônias de bactérias em contador digital (Gallenkamp, Inglaterra) e dividiu-se, o número de unidades formadoras de colônias pelo peso de cada amostra, para que se obtivesse o valor de UFC por miligrama de dentina cariada. Detalhes da descrição da metodologia utilizada estão apresentados nas figuras 1 a 4 e 8 a 16 do apêndice (Capítulos 1 e 2). Para padronizar os valores obtidos em cada espécime com seu controle, este foi considerado como máximo de contaminação (100%) e os demais valores para os espécimes dos grupos experimentais foram obtidos segundo sua proporção em relação ao grupo controle que foi denominada Fração de Sobrevivência (FS).

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se a análise de variância a dois critérios fixos ( $p \leq 0,05$ ) e comparações múltiplas de Tukey, após a transformação logarítmica dos valores obtidos.

Após observarmos a variação da Fração de Sobrevivência (FS) para as diferentes concentrações de TBO e tempos de irradiação ou doses de luz, elaboramos uma expressão empírica que relaciona o FS com a concentração e a dose de luz utilizada. Como primeiro passo, consideramos a variação da FS na ausência de luz para esse regime:

$$\begin{array}{l} C \longrightarrow 0 \longrightarrow FS = 1 \\ C \longrightarrow \infty \longrightarrow FS = 0 \end{array} \quad \text{Onde } C = \text{concentração do fotossensibilizador}$$

Determinando uma expressão do tipo :

$$FS(D = 0) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0}} \quad \text{Onde } D = \text{dose de luz e } C \text{ é expressa em mg/ml}$$

$C_0 \sim 1 \text{mg/mL}$

A presença da luz faz com que o efeito tóxico da droga seja aumentado. Assim, à medida que a dose de luz é aumentada, a toxicidade também é intensificada chegando-se a seguinte expressão:

$$FS(D, C) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

### **Resultado**

O grupo TBO A (TBO 0,025 mg/mL, sem aplicação de luz) apresentou maior média de proporção de UFC por miligrama de dentina cariada com relação ao grupo controle. Também pudemos perceber que o aumento no tempo de irradiação produziu menores valores de UFC por miligrama de dentina cariada e à medida que a concentração aumentava, esses valores também diminuíram (Gráfico1).

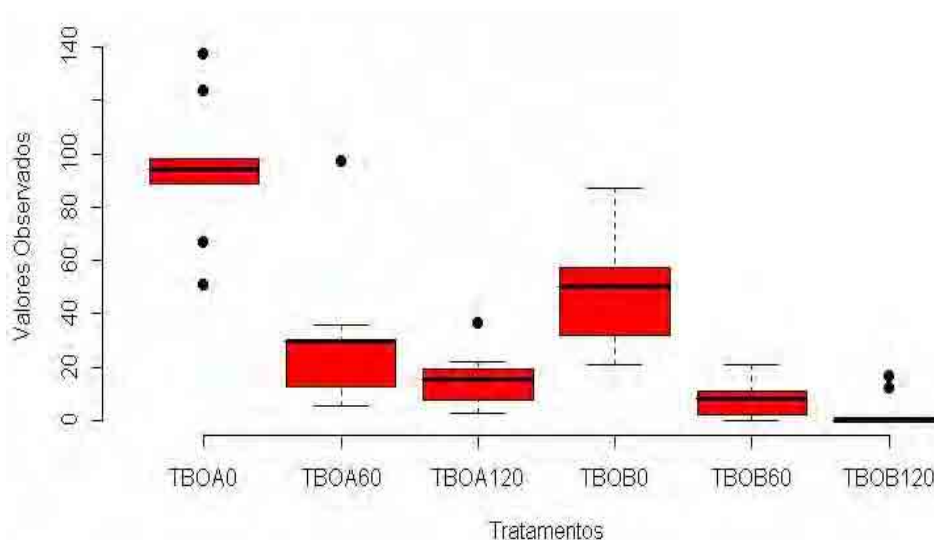


GRÁFICO 1- Valores representativos das UFC/ mg de dentina cariada de acordo com a concentração do fotossensibilizador e o tempo de exposição à luz.

A aplicação da análise de variância aos dados obtidos, revelou que os fatores são significativos isoladamente, mas não conjuntamente. Assim, como os fatores não interagiram, foram analisados separadamente, procurando evidenciar os melhores níveis para cada um.

Tabela 1 - Análise de Variância aplicada aos valores de UFC observados

Componentes	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p valor
<b>Modelo</b>	5	87,2977385	17,4595477	25,18	<.0001*
<b>Concentração</b>	1	23,64788992	23,64788992	34,11	<.0001*
<b>Irradiação</b>	2	60,21303608	30,10651804	43,43	<.0001*
<b>Concentração*Irradiação</b>	2	3,43681252	1,71840626	2,48	0.0945
<b>Erro</b>	48	33,2772663	0,6932764		
<b>Total</b>	53	120,5750048			

\* significância estatística

Para evidenciar o melhor nível de cada fator, onde a proporção de Unidades Formadoras de Colônias foi mínima, utilizou-se o método de Comparações Múltiplas de Tukey, tendo sido as comparações realizadas para cada nível de cada fator (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação Múltipla de Tukey aplicada ao fator concentração

<b>Grupos de Tukey</b>	<b>Média do logaritmo das Respostas</b>	<b>N</b>	<b>Níveis de Concentração</b>
A	3,4170	27	1
B	2,0935	27	2

Médias com mesmas letras são não significativamente diferentes.  
Diferença Mínima Significativa: 0,4556

A Tabela 2, na qual os níveis de Concentração são comparados, evidenciou que a concentração B (TBO = 0,1mg/mL) foi a mais eficaz. Para o fator tempo de irradiação todos os níveis foram considerados diferentes estatisticamente, sendo o mais eficaz o terceiro nível (120s), D=48 J/cm<sup>2</sup> (Tabela 3).

Tabela 3- Comparação Múltipla de Tukey aplicada ao fator tempo de irradiação

<b>Grupos de Tukey</b>	<b>Média do logaritmo das Respostas</b>	<b>N</b>	<b>Níveis de Irradiação</b>
A	4,1840	18	1
B	2,4173	18	2
C	1,6645	18	3

Médias com mesmas letras são não significativamente diferentes  
Diferença Mínima Significativa: 0,6712

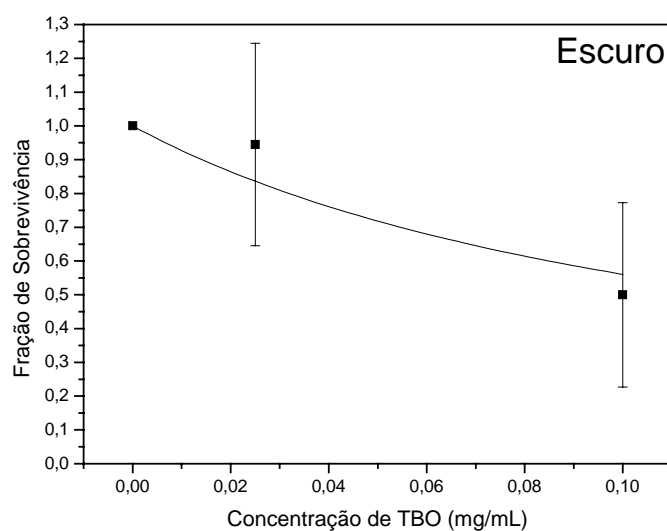


Observamos que a combinação que minimiza a variável de interesse (proporção de UFC/mg de tecido cariado) com maior eficácia é a segunda Concentração B (TBO = 0,1 mg/mL) com 120s de exposição,  $D=48 \text{ J/cm}^2$ .

Assim, aplicando a expressão proposta:

$$FS(D, C) = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

Observamos que o efeito tóxico do TBO na ausência de luz, é discreto, e, que o aumento da dose de luz em ambas concentrações provocou redução significativa da FS (Gráficos 2,3 e 4).



$$FS = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

Onde  
 $D_0=9 \text{ J/cm}^2$   
 $D= 0 \text{ J/cm}^2$   
 $C_0=0,13\text{mg/mL}$

Gráfico 2 - FS em relação à concentração de TBO sem aplicação de luz.

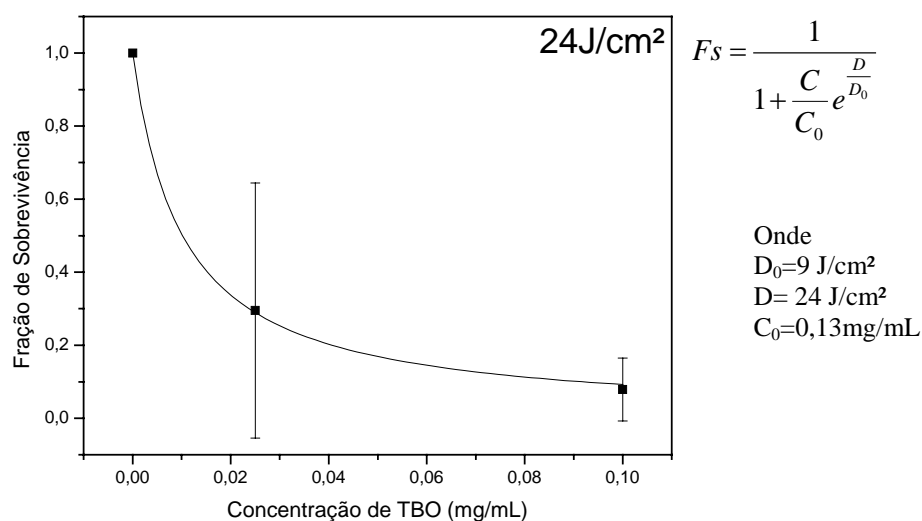


GRÁFICO 3 - FS em relação à Concentração de TBO, quando é aplicada uma dose de 24J/ cm<sup>2</sup> de luz.

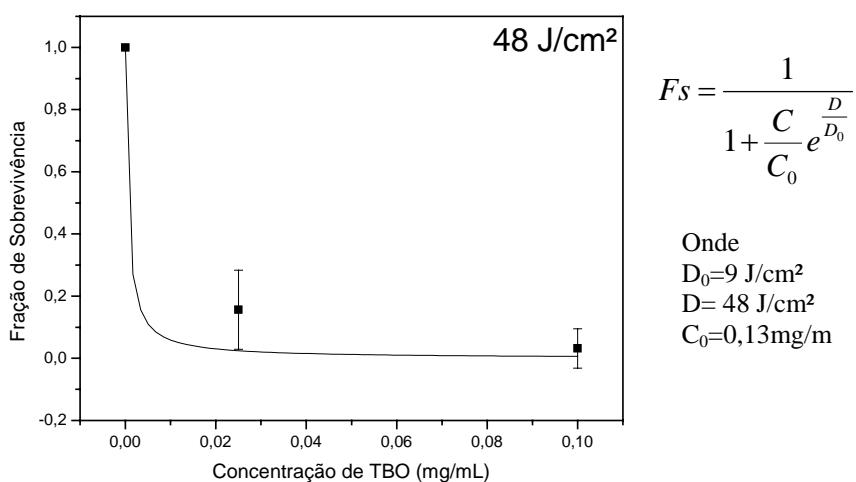
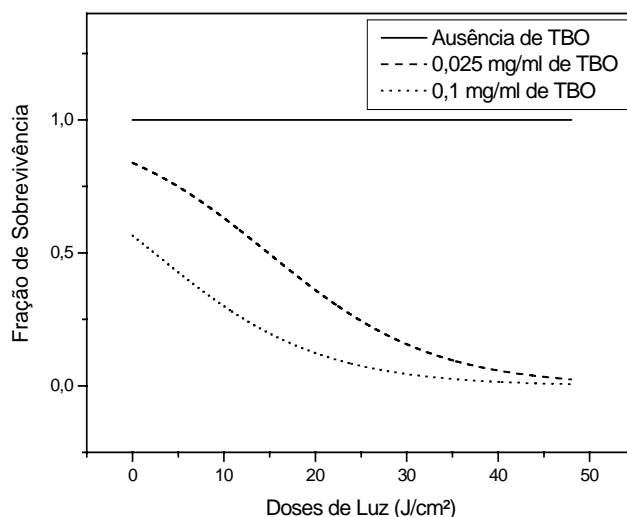


GRÁFICO 4 - FS em relação à Concentração de TBO, quando é aplicada uma dose de 48J/ cm<sup>2</sup> de luz.

Ainda baseados na expressão proposta, pudemos construir um gráfico de FS em função da dose de luz através do qual é possível calcular a FS de acordo com a concentração do fotossensibilizador e a dose de luz empregada. Ficou então evidente que à medida que a concentração aumenta, menor é a dose de luz necessária para eliminar a mesma quantidade de microrganismos.



$$FS = \frac{1}{1 + \frac{C}{C_0} e^{\frac{D}{D_0}}}$$

Onde

$$D_0 = 24 \text{ J/cm}^2$$

$$C_0 = 0,13 \text{ mg/mL}$$

GRÁFICO 5 - FS em função da dose de luz.

Com essa expressão, pudemos definir também a chamada região de segurança, determinando os parâmetros de D (dose) e C (concentração) para obtenção de valores de FS < 90%, 95% e 99 %, ou seja, a relação entre a dose de luz e a concentração de fotossensibilizador capaz de eliminar entre 90 e 99% dos microrganismos presentes. (Gráfico 6).

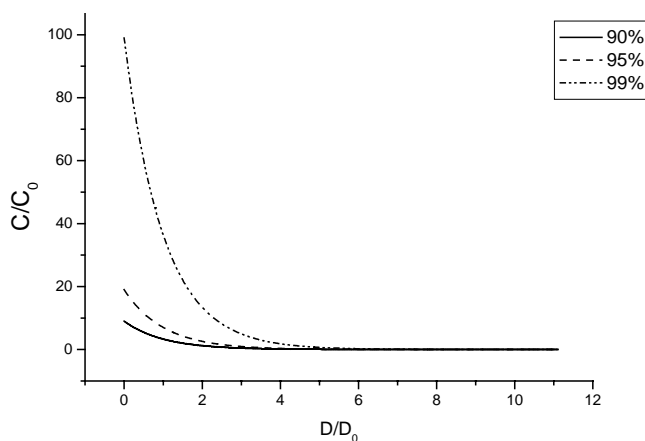


GRÁFICO 6 – Correlação entre concentração de fotossensibilizador e dose de luz para redução microbiana de 90%, 95% e 99%.

## ***Discussão***

Desde 1900 sabe-se que é possível provocar a morte de bactérias através da associação de luz visível a fotossensibilizadores. A luz em um comprimento de onda inferior a 300 nm é absorvida por proteínas e ácidos nucleicos e isso pode resultar na morte celular, principalmente através da desnaturação do DNA. Devido a esse potencial mutagênico, emissão luminosa nessa faixa de comprimento de onda, como a ultravioleta, não é apropriada para o tratamento de infecções em seres humanos.<sup>20</sup>

Mais recentemente, a administração de um fotossensibilizador que exibe uma predileção por células tumorais e a irradiação da região com uma luz *laser* vermelha, recebeu o nome de terapia fotodinâmica – PDT e tem sido utilizada no tratamento do câncer.<sup>5,12</sup> Na odontologia essa técnica vem sendo empregada para eliminar microrganismos presentes na cavidade bucal. Corantes que se fixem à parede bacteriana e tenham picos de absorção próximos ao comprimento de onda do *laser* utilizado, levam à absorção de fótons pelo corante, que é convertido a um estado excitado. A energia transferida para as moléculas vizinhas pode resultar na formação de moléculas reativas como oxigênio singlete, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres, capazes de provocar danos e até matar as bactérias.<sup>4,17,20,21</sup>

A seleção de um fotossensibilizador efetivo é essencial para o sucesso da técnica. Além de não apresentar risco de toxicidade ao ser humano, o fotossensibilizador ideal deve absorver bem a luz no comprimento de onda

utilizado na irradiação, ter uma alta capacidade de produzir oxigênio singleto e este deve ter uma vida longa (alguns microssegundos).<sup>20</sup>

Ito<sup>5</sup> (1970) demonstrou que o corante TBO era fotodinamicamente ativo, provocando a morte celular sem indução de alteração genética, e que provavelmente, a membrana celular fosse o local onde o oxigênio singleto agia para inativar as células de levedura, causando aumento da permeabilidade ou perda do controle da permeabilidade, resultando em desequilíbrio das substâncias intracelulares e morte celular sem aparente dano cromossômico. Em 1995, Paardekooper et al.<sup>10</sup> observaram que o Azul de Toluidina (TB) entrava na célula durante a iluminação devido a uma mudança súbita das propriedades da membrana celular e estruturas intracelulares eram danificadas. Desse modo, além do dano causado à membrana plasmática, o dano fotodinâmico também atingiria estruturas intracelulares.

O efeito do TBO associado à luz *laser* sobre microrganismos bucais foi também reportado por Donbson e Wilson<sup>4</sup> (1992) que observaram a sensibilização pelo TBO (0,01% e 0,1%) de *Streptococcus sanguis*, *Porfiromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, em biofilmes com a morte bacteriana evidente após exposição à luz *laser* de HeNe 7,3 mW, por 30s, energia de 219 mJ e dose de 16,5 J/ cm<sup>2</sup>. Okamoto et al.<sup>9</sup> também, reportaram a morte de várias espécies de *Streptococcus* utilizando um *laser* de HeNe energia de 720 mJ, numa dose de 5,7 J/ cm<sup>2</sup> na presença de corantes como o TBO (7,5 µg/mL). e, Burns et al<sup>3</sup>,1993 observaram que quando uma suspensão de bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*,

*Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* foram expostas a uma luz laser de HeNe 7,3 mW na presença de TBO, uma considerável taxa de morte celular foi conseguida quando a concentração de corante utilizada foi 50µg/mL e a dose de energia 33,6 J/cm<sup>2</sup>.

A efetividade do corante TBO associado ao LED na descontaminação de dentina cariada não foi ainda amplamente estudada. A utilização de dentina artificialmente cariada, neste estudo, teve como objetivo a padronização do tecido cariado com relação às características clínicas de textura e consistência e o controle do tipo de microrganismos presentes na massa de tecido cariado. Estudos que avaliaram o efeito do TBO sobre bactérias cariogênicas, foram realizados com microrganismos em suspensão, e sabemos que o efeito da luz está altamente relacionado com o tecido alvo, devido à interação tecidual que ocorre no momento da irradiação<sup>3,4,16,17</sup>.

Os resultados obtidos evidenciaram que, tanto o aumento da concentração, como o aumento da dose de luz, foram capazes de provocar redução na Fração de Sobrevivência (FS) e que não existiu interação entre esses fatores, ou seja, irradiação e concentração são importantes para explicar a redução na FS (Tabelas 2 e 3). A mesma observação ocorre na comparação dos Gráficos 2, 3 e 4, que nos mostram a baixa toxicidade do TBO na ausência de luz (Gráfico 2) e sua fototoxicidade, ampliada à medida que a dose de luz aumenta (24 J/cm<sup>2</sup> e 48 J/cm<sup>2</sup>), (Gráficos 3 e 4).

Wilson et al.<sup>20</sup> (1995) reportaram que o aumento da energia dos lasers de GaAs (11 mW, diâmetro do feixe 9 mm e comprimento de onda 660nm,

modo pulsado com frequência de 20 kHz) associado ao fotossensibilizador AlPcS<sub>2</sub> e o *laser* de HeNe (7,3 mW, diâmetro do feixe e 632,8 nm de comprimento de onda) associado ao fotossensibilizador TBO, provocava a redução de *Streptococcus* sp. e *Actinomyces* sp. No entanto é interessante observar que, devido ao fato dos autores não possuírem *lasers* mais potentes, esse aumento de energia (de 0,44 J para 1,31 J para o *laser* de HeNe e 0,59 J para 1,78 J para o *laser* GaAs) foi obtido através do aumento do tempo de exposição.

Em 2003, o mesmo grupo de pesquisadores<sup>16</sup> testou um equipamento mais potente (80 mW, comparado com 7,3 mW do equipamento anterior) com um novo sistema de entrega de luz através de um cabo de fibra óptica de 800 µm de diâmetro cuja densidade máxima na superfície da ponta era de 4 W/cm<sup>2</sup>, comparado a 0,6 W/cm<sup>2</sup> do equipamento anterior, e observaram que o novo sistema era muito mais eficiente na redução do número de *S. mutans* em suspensão. Atribuíram esse resultado ao tamanho reduzido da ponta emissora de luz que pode ser colocada em contato direto com a suspensão bacteriana e que a dose era maior na superfície da ponta (100 J/cm<sup>2</sup>). Concluíram que existia uma potência mínima de energia, capaz de provocar a morte bacteriana e que era improvável que a dose de energia fosse o fator mais importante na morte bacteriana.

Os estudos sobre o azul de toluidina O utilizado como fotossensibilizador que utilizaram o *laser* como fonte de luz<sup>3,9,11,16,18,20,21</sup> foram realizados com bactérias em suspensão. No entanto, outras pesquisas que utilizaram bactérias aderidas à dentina ou à uma matriz de colágeno, revelaram

que a redução de *S mutans* presentes em dentina cariada e em matriz de colágeno foram semelhantes, porém menores que a redução observada quando as bactérias estavam em suspensão e, concluíram que o tempo de contato entre a bactéria e o TBO é um fator crítico.<sup>19</sup>

No Gráfico 5 comparando a FS nas diferentes concentrações do TBO e diferentes doses de luz, observamos que o aumento da concentração no escuro, aumenta sua toxicidade e que, à medida que a dose de luz aumenta, o fator de sobrevivência é consideravelmente reduzido para ambas as concentrações. Dentre as combinações testadas, a TBO B 120 ( 0,1 mg/mL e D= 48J/ cm<sup>2</sup>), foi a mais eficaz, fato que também pode ser verificado através do método de comparações múltiplas de Tukey (Tabelas 2 e 3).

O cálculo da dose de luz e concentração de fotossensibilizador indicados para alcançarmos 90%, 95% e 99% de morte bacteriana está descrito no Gráfico 6. Por meio dessa função pudemos definir a meta em relação à porcentagem de morte bacteriana e ajustarmos a concentração de fotossensibilizador e a dose de luz, de acordo com nossa disponibilidade, a fim de obtermos o efeito desejado. Pudemos observar ainda, que devido à sua fototoxicidade elevada, em altas doses de luz, é possível reduzir drasticamente a concentração do fotossensibilizador e, ainda, assim obter valores consideráveis na redução da FS, fato este relevante, uma vez que, quanto maior a concentração do fotossensibilizador, maior a sua toxicidade na ausência de luz.



## **Referências**

1. BEDWELL, J.; HOLTON, J.; VAIRA, D.; MACROBERT, A .J.; BOWN, S.G. In vitro killing of *Helicobacter pylori* with photodynamic therapy. **Lancet**, London, v.26, n.335, p.1287, May 1990.
2. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.29, n.3, p.192-197, 1995.
3. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from helium-neon laser. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.38, n.6, p.401-405, June 1993.
4. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.37, n.11 , p. 883-887, Nov. 1992.
5. ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.25, n.1, p.47-53, Jan. 1977.
6. LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWIMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates – theory and practice. **J. Photochem. Photobiol. B., Biol**, Lausanne, v.60, n.1, p. 37-43, Apr. 2001.
7. LUI, H.; HOOPS, L.; TOPE, W.D.; LEE, P.K.; ELMETS, C.; PROVOST, N.; CHAN, A.; HEYNDORFF, H.; SU, X.Y.; JAIN, H.; HAMZAVI, I.; McLEAN, D.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy of multiple

- nonmelanoma skin cancers with verteporfin and light-emitting diodes. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.140, n.1, p 26- 32, Jan. 2004.
8. MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 23,n 2, p. 237-243, 2000.
  9. OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.12, n. 4, p. 450-458, 1992.
  10. PAARDEKOOPEER, M.; DE BRUIJNE A.W.; VAN STEVENINCK J.; VAN DEN BROEK, P. J. A. Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment with Toluidine Blue. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.61, n.1, p. 84-89, Jan. 1995.
  11. SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 3, p. 204-210, May 1993.
  12. SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 869-880, Aug. 2000.
  13. SOUKOS, N.S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGH, P.M. Photodynamic effects of Toluidine Blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.18, n. 3, p. 253-259, 1996.
  14. YANG, C.H.; LEE, J.C.; CHEN, C.H.; HUI, C.Y.; HONG, H.S.; KUO, H.W. Photodynamic therapy for bowenoid papulosis using a novel incoherent light-

- emitting diode device . **Br. J. Dermatol.**, Oxford v.149, n. 6, p. 1292-1308, Dec. 2003.
15. WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of Toluidine Blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 37, n. 3, p.190-193, May/June 2003.
16. WILLIAMS, J.A.; PEARSON G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The photoactivated antibacterial action of Toluidine Blue O in a collagen matrix and carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v.38, n.6, p.530-536, Nov/Dec. 2004.
17. WILSON, B.C. Light sources for photodynamic therapy. **Photodynamic Therapy News**, v.1, p.6-8, 1998.
18. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, London v. 44, n. 2, p. 181-189, Apr. 1994.
19. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, n. 5, p.569-574, May 1995.
20. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.8, n.3, p.182-187, June 1993.
21. ZANIN, I.C.; GONÇALVES, R.B.; JUNIOR, A.B.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy:

an in vitro study. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.56, n.2, p.324-330,  
Aug.2005.

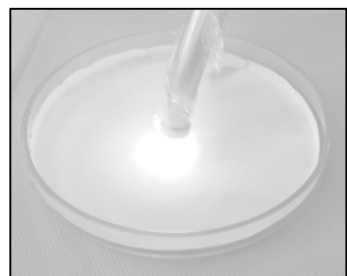
---

---

# CAPÍTULO 3

---

---



**Avaliação da incorporação do Photogem® e TBO em dentina  
bovina sadia e cariada**

**GIUSTI, Juçaira S. M.\***

**RIBEIRO FIGUEIREDO, Augusto Cesar\*\***

**SANTOS-PINTO, Lourdes\*\*\***

**MORIAMA, Lilian T.\*\*\*\***

**BAGNATO, Vanderlei S.\*\*\*\*\***

Endereço para correspondência:

Profa. Dra.Lourdes Santos-Pinto

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903 Araraquara – SP – Brasil

Fax: 55- 16- 33016330

\* Mestre em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Araraquara –  
UNESP

\*\* Mestre em Ciências e Engenharia dos Materiais pelo Instituto de Física de São  
Carlos- USP

\*\*\* Prof. Adjunto do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – UNESP

\*\*\*\* Mestranda em Física pelo Instituto de Física de São Carlos - USP

\*\*\*\*\* Prof. Titular do Departamento de Física e Ciências dos Materiais do  
Instituto de Física de São Carlos – USP

### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar a incorporação dos fotossensibilizadores Photogem<sup>®</sup> e Azul de Toluidina O – TBO em dentina bovina sadia e artificialmente cariada. Cavidades padronizadas foram realizadas em dentina, na face vestibular de incisivos bovinos, que foram imersos em um meio de cultura estéril acrescidos de *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>8</sup> UFC e *Streptococcus mutans* 10<sup>8</sup> UFC para a indução da cárie artificial. Em seguida, diferentes concentrações do fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup>: PA= 1mg/mL, PB= 2 mg/mL e PC= 3 mg/mL e do TBO: 0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL foram aplicados às cavidades durante 60s. As medidas e leitura de fluorescência em dentina sadia previamente ao desenvolvimento da carie artificial, em dentina cariada e cariada após a aplicação dos fotossensibilizadores foram feitas por um aparato experimental composto por um laser de excitação (532 nm), espectrômetro, computador com programa de aquisição LightView e uma sonda tipo Y. Pudemos observar que houve uma maior incorporação do Photogem<sup>®</sup> em tecido cariado que em tecido sadio e que não houve diferença na incorporação do fotossensibilizador entre as concentrações testadas. Para o TBO embora tenha ocorrido uma maior intensidade da fluorescência em dentina cariada e após a fotossensibilização, não houve variação evidente no parâmetro de incorporação do TBO, revelando uma menor seletividade pelo tecido cariado. Com base nos resultados obtidos pudemos concluir que a incorporação do Photogem<sup>®</sup> em dentina bovina foi mais seletiva para o tecido cariado que para o TBO e que o aumento da concentração do fotossensibilizador não aumentou a incorporação do mesmo.

**Palavras-chave:** Fotoquimioterapia; fluorescência; dentina; luz; laser; bactéria

***Abstract***

The aim of this study was to evaluate the incorporation of two photosensitizers: Photogem<sup>®</sup> e Toluidine Blue O (TBO) in dental cavities prepared on health and artificially carious bovine dentin. Photosensitizer Photogem<sup>®</sup> in three different concentrations (PA= 1 mg/mL, PB = 2 mg/mL e PC= 3 mg/mL) and TBO in two different concentrations (0.025 mg/mL e 0.1 mg/mL) were applied for 60s in the cavities. For each experimental condition (health dentin, carious dentin and carious dentin with photosensitizer) six spectra were taken measured by a spectral fluorescence system consisted of laser, optical probe, spectrophotometer and computer. There was more incorporation of Photogem<sup>®</sup> by carious dentin than by health dentin, and the photosensitizer incorporation was similar in the three different concentrations. When TBO was applied as photosensitizer, although greater fluorescence intensity was observed, there was not an evident variation in the parameter of TBO incorporation showing lower selectivity for the carious tissue. Based in these results we concluded that Photogem<sup>®</sup> incorporation in carious bovine dentin was more selective than TBO, and higher concentrations did not improve photosensitizer incorporation.

***Key-words:*** Fluorescence spectroscopy; photodynamic therapy; bovine dentin; photosensitizer.



## ***Introdução***

O emprego da técnica da terapia fotodinâmica na eliminação dos microrganismos presentes na cavidade bucal, em especial aqueles presentes na cárie dentária, vem sendo apontado como uma alternativa promissora para a descontaminação do tecido cariado.<sup>5</sup> Uma das vantagens na utilização dessa técnica, é a seletividade, uma vez que sua ação somente ocorre na região onde há presença de um fotossensibilizador ativado por uma fonte de luz. Assim sendo, é possível delimitarmos o raio de ação desejado, restringindo o local de aplicação do fotossensibilizador e da luz.<sup>4,5,14,22,23,26,27</sup>

Inicialmente o efeito bactericida da terapia fotodinâmica foi estudado sobre microrganismos em suspensão.<sup>5,14,22,27</sup> Recentemente, novos estudos começaram a avaliar a efetividade dessa terapia em microrganismos presentes em biofilme, aderidos à dentina e à matriz de colágeno.<sup>4,6,23,28</sup> A mudança no perfil das pesquisas ocorreu devido ao conhecimento da importância do efeito da interação da luz com o tecido alvo uma vez que a terapia fotodinâmica tem se mostrado menos efetiva na redução de bactérias presentes em dentina e em matriz de colágeno do que em suspensão (Williams et al.,<sup>23</sup> 2004)

A avaliação da eficiência de uma terapia que envolve a ação de um fármaco e sua fotoativação para a indução da resposta desejada, deve levar em consideração, no caso específico da aplicação em dentina, a incorporação do fotossensibilizador pelo tecido dental e a interação luz/tecido, principalmente considerando os fenômenos de absorção e espalhamento da luz. Porém, ainda não está claro na literatura como ocorre a incorporação dos fotossensibilizadores ao

tecido dentário sendo este um ponto fundamental para o sucesso da técnica. Da mesma forma, não foi ainda reportado se existe uma maior incorporação do fotossensibilizador no tecido cariado em relação ao tecido sadio, ou seja, uma seletividade destas substâncias pelo tecido afetado pela doença, fato que contribuirá de forma decisiva para a utilização desta técnica como meio de descontaminação de dentina cariada.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica capaz de detectar e caracterizar mudanças físicas e químicas que ocorrem nos materiais, através do estudo do espectro de absorção-emissão e relaxamento cinético.<sup>1</sup> Embora esta técnica venha sendo bastante estudada como um método alternativo de diagnóstico precoce da cárie dentária, também é possível utilizá-la para avaliar a incorporação dos fotossensibilizadores pelo tecido dentário.<sup>1,8,10,17,20</sup>

A análise por fluorescência é um método não invasivo no qual emprega-se apenas instrumental óptico para a identificação de componentes. A fluorescência traz informação sobre a estrutura química das moléculas, sendo, portanto um método de análise bastante sensível. A espectroscopia de fluorescência pode ser empregada no monitoramento e na detecção de agentes fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica uma vez que eles fluorescem, ou seja, são capazes de absorver energia luminosa e posteriormente liberar o excesso de energia também na forma de luz, a fluorescência.

O objetivo desse estudo foi, portanto, avaliar através da espectroscopia de fluorescência a incorporação das diferentes concentrações de

fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica, Photogem<sup>®</sup> e Azul de Toluidina O – TBO, na dentina bovina sadia e cariada artificialmente.

### ***Material e Método***

Dezoito incisivos bovinos íntegros foram isolados com resina epóxi e esmalte cosmético na região da coroa. Cavidades padronizadas foram então preparadas em dentina, nas faces vestibulares, utilizando-se uma fresa diamantada cônico-invertida (FG 1036G – KG Sorensen do Brasil) montada em alta rotação. Na porção radicular de cada dente foi confeccionado um orifício para a adaptação de um fio ortodôntico dobrado em forma de gancho utilizado para pendurar os dentes a uma tela de arame .

Na seqüência os dentes foram armazenados em água destilada até o início do experimento, quando foram autoclavados por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C e introduzidos em uma suspensão para desenvolvimento de cárie artificial; preparada uma infusão de cérebro-coração modificada ( BHI 3,7 g/ 100 mL, extrato de levedo 0,5 g / 100 mL, glicose 1g/ 100 mL e sacarose P.A. 2g / 100 mL) e a cada 50 mL dessa suspensão foram acrescentados 5 mL de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC#ITAL-523) - 10<sup>8</sup> UFC e 5 mL *Streptococcus mutans* (ATCC25175) - 10<sup>8</sup>UFC, com o intuito de promover a colonização bacteriana. Nesse caldo os dentes ficaram imersos a 37<sup>0</sup>C, em microaerofilia, por 14 dias sendo o mesmo trocado cada 48 horas. Após esse período, os dentes foram mantidos sob refrigeração a 4<sup>0</sup>C, com a finalidade de inibir a multiplicação bacteriana, até o momento do tratamento.

Dois fotossensibilizadores diluídos em água, um derivado de hematoporfirina, o Photogem<sup>®</sup> nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL e um corante básico, Azul de Toluidina O (TBO) nas concentrações de 0,025 e 0,1 mg/mL foram utilizados neste experimento. Foram realizadas 32 medidas de autofluorescência em dentina sadia previamente à esterilização dos espécimes e 32 medidas de autofluorescência na dentina após o desenvolvimento da cárie. Após a aplicação dos fotossensibilizadores (até o preenchimento da cavidade) durante 60s tanto em dentina sadia como em dentina cariada, as cavidades foram lavadas em água corrente por 60s e secas com ar comprimido por 10s quando foram realizadas 6 medidas de fluorescência para cada concentração de fotossensibilizador.

O aparato experimental utilizado para leitura por fluorescência (Clusta MTD, Rússia) é composto por um *laser* de excitação (442 ou 532 nm), espectrômetro, computador com programa de aquisição LightView e uma sonda tipo Y. O *laser* de excitação acoplado à fibra óptica é entregue à superfície de dentina analisada e a sonda deve ser mantida perpendicularmente em contato com o tecido irradiado. A outra extremidade da sonda é conectada ao espectrômetro, levando a luz coletada do tecido. A sonda Y é composta por uma fibra central, que leva a luz de excitação e seis fibras ao redor coletoras da luz emitida pelo tecido avaliado. O espectrômetro está conectado ao computador e ao programa LightView que fornece os resultados obtidos da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Neste trabalho o *laser* de excitação utilizado foi no comprimento de onda de 532 nm, na região do verde do espectro eletromagnético.

Detalhes da descrição da metodologia utilizada estão apresentados nas figuras 1 a 6 do apêndice (Capítulo 3).

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados graficamente utilizando o programa LightView.

### ***Resultados***

Os dados de fluorescência obtidos refletem a relação da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Para a análise desses dados foi realizada uma normalização de todo o espectro pela máxima intensidade na região do comprimento de onda de excitação (532 nm).

Após a análise dos espectros de autofluorescência da dentina sadia e cariada, da fluorescência da dentina cariada na presença das três diferentes concentrações de Photogem<sup>®</sup> utilizadas (PA= 1mg/mL, PB=2 mg/mL e PC= 3 mg/mL), obtivemos o Gráfico 1 que representa a média dos espectros coletados em cada grupo. Como os espectros de fluorescência para as três concentrações do Photogem<sup>®</sup> foram semelhantes optamos pelo PA para elaboração do gráfico.

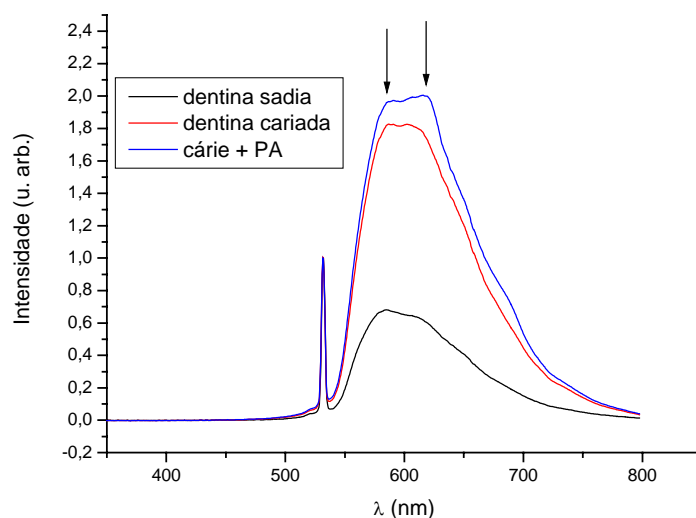


GRÁFICO 1- Representação da autofluorescência da dentina sadia e cariada e fluorescência da dentina cariada na presença de Photogem.<sup>®</sup>

Neste gráfico observamos que a dentina cariada apresenta maior intensidade de autofluorescência total que a dentina sadia e há uma maior contribuição da emissão na região de 620 nm.

A fluorescência do tecido cariado submetido a fotossensibilização com Photogem<sup>®</sup> na concentração 1 mg/mL mostra uma maior emissão em 620 nm, evidenciando a incorporação de porfirina exógena neste tecido.

As setas indicam dois comprimentos de onda (585 e 620 nm) escolhidos para determinação do “parâmetro de incorporação da porfirina em dentina”. Esse parâmetro é determinado pela razão entre a amplitude de emissão em 620nm e pela amplitude de emissão em 585nm. Desta forma, quanto maior o valor calculado, maior a incorporação de porfirina pelo tecido, uma vez que a região ao redor de 620nm está evidenciando uma maior quantidade de porfirina no tecido. Os parâmetros de incorporação do Photogem<sup>®</sup> pela dentina sadia bem

como pela dentina cariada, em relação à concentração do mesmo estão descritas no Gráfico 2.

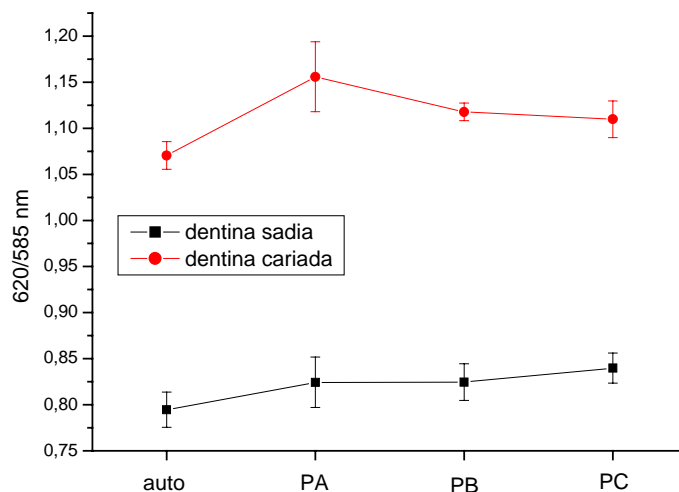


GRÁFICO 2 : Incorporação das diferentes concentrações de Photogem® na dentina sadia e cariada.

A incorporação em tecido cariado foi mais evidente na concentração PA= 1mg/mL, mantendo-se praticamente estável para as outras concentrações

As médias dos espectros obtidos após a análise dos espectros de autofluorescência da dentina sadia e cariada, da fluorescência da dentina cariada na presença das duas diferentes concentrações de TBO utilizadas (TBO = 0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL ) estão representadas no Gráfico 3.

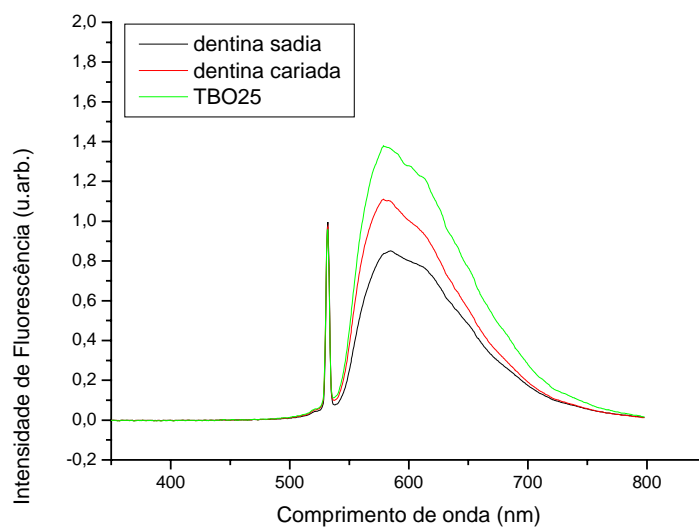


GRÁFICO 3 - Representação da autofluorescência da dentina sadia e cariada e fluorescência da dentina cariada na presença de TBO

Observamos através do Gráfico 3 que a dentina cariada também apresenta maior autofluorescência que a dentina sadia, porém não há evidência de um aumento da intensidade de fluorescência em uma determinada região, esse aumento ocorre no espectro como um todo, não existindo uma banda de emissão mais característica.

Para a determinação do parâmetro de incorporação do TBO em dentina as regiões espectrais escolhidas foram 578 e 612nm. Os parâmetros de incorporação do TBO pela dentina sadia bem como pela dentina cariada, em relação à concentração do mesmo estão descritos no Gráfico 4.



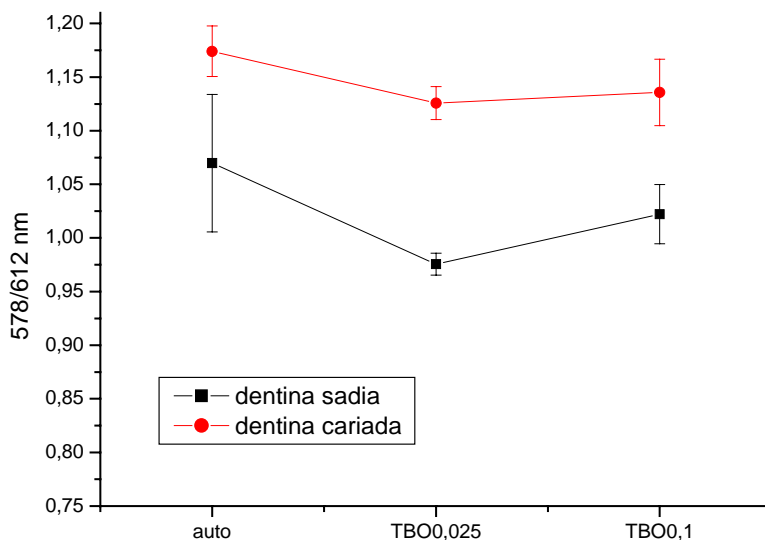


GRÁFICO 4 – Incorporação das diferentes concentrações de TBO na dentina sadia e cariada.

Embora tenha ocorrido uma maior intensidade da fluorescência como um todo em dentina cariada após a sensibilização com TBO, não houve variação evidente no parâmetro de incorporação do TBO, revelando uma menor seletividade do TBO pelo tecido cariado em comparação como Photogem<sup>®</sup>.

As Figuras 1 a e b mostram respectivamente o aspecto clínico das cavidades após a aplicação dos fotossensibilizadores Photogem<sup>®</sup> e TBO, onde podemos evidenciar a pigmentação residual causada pelo TBO, após a lavagem em água corrente e secagem com ar comprimido.



FIGURA 1 – Pigmentação das cavidades após a aplicação do fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup> (a) e TBO (b).

## *Discussão*

Até que ponto o tecido dentinário de um preparo cavitário deve estar livre de microrganismos antes da realização da restauração? Essa pergunta foi feita por Kidd<sup>7</sup> (2004) e ainda continua sem resposta. Após a revisão da literatura feita pelo autor, o mesmo concluiu que não há evidências claras o bastante de que seja prejudicial a manutenção de dentina infectada, ainda que a mesma esteja úmida e macia, previamente à restauração da cavidade. Dessa forma, põe dúvida a relevância das técnicas de descontaminação do tecido remanescente após o preparo cavitário. Porém, o próprio autor sugere que sejam realizados novos estudos para responder perguntas tais como: como os microrganismos remanescentes sobrevivem? Eles sofrem mudanças em seu fenótipo ou em seu genótipo? Eles continuam a desmineralizar a dentina? Como a polpa reage a sua presença a curto e longo prazo?

Partindo do princípio de que os microrganismos relacionados ao desenvolvimento da cárie estão presentes na cavidade bucal apenas em uma situação patológica, acreditamos que a eliminação dos mesmos presentes no tecido dentinário remanescente após o preparo cavitário proporcionaria uma condição mais semelhante à condição fisiológica favorecendo as condições de reparo do tecido afetado. Assim sendo, o emprego da terapia fotodinâmica na eliminação desses microrganismos seria uma alternativa promissora.

Uma desvantagem na utilização da terapia fotodinâmica na eliminação de microrganismos bucais seria o alto custo dos equipamentos para sua realização, uma vez que até recentemente, a fonte de luz mais empregada para sua realização

era o *laser*. Porém, com o desenvolvimento de novas fontes de luz, como os LED essa desvantagem passa a não existir, pois esses aparelhos são de baixo custo, fácil operação e manutenção. Estudos na área médica têm demonstrado a efetividade da terapia fotodinâmica utilizando o LED como fonte ativadora.<sup>11,18</sup>

Embora a eficácia desta técnica sobre microrganismos em suspensão já tenha sido evidenciada<sup>5,6,14,24,25,26,27</sup> e estudos recentes, com os microrganismos em biofilme, aderidos à dentina ou matriz de colágeno também comprovaram sua eficácia,<sup>6,23,28</sup> a resposta induzida e sua aplicação em tecidos duros dentais ainda são temas a serem investigados. Nesse sentido, o estudo da incorporação dos fotossensibilizadores é de grande relevância, considerando que a efetividade da terapia fotodinâmica depende da incorporação, pelo tecido afetado, de um agente fotossensibilizador e sua ativação por luz.

O principal mecanismo de ação da terapia ocorre após a excitação do fotossensibilizador que promove principalmente a modificação do estado eletrônico do oxigênio presente nos tecido. O oxigênio utilizado fisiologicamente nas reações celulares está num estado eletrônico chamado tripleto. Ao contrário, o oxigênio singlete formado na reação fotodinâmica é altamente reativo, levando à morte bacteriana.<sup>16</sup> As modificações que ocorrem nos componentes da membrana citoplasmática da bactéria parecem ser os maiores responsáveis por sua morte, por isso há uma maior dificuldade na eliminação de bactérias gram-negativas, devido a maior complexidade de sua parede celular.<sup>13,21</sup>

A espectroscopia de fluorescência é um método bastante viável para o monitoramento da incorporação de fotossensibilizadores, uma vez que mostra a

resposta em tempo real através de um procedimento não invasivo e não destrutivo, permitindo a análise *in situ*. Além disso, dentro de um regime de não-saturação, a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do composto fluorescente.

Neste estudo pudemos observar que a autofluorescência da dentina cariada foi maior que da dentina sadia decorrente das alterações teciduais na região espectral ao redor de 620-630nm. Esse fato ocorreu provavelmente, devido à presença de porfirinas endógenas produzidas pelas bactérias presentes na lesão de cárie, como já havia sido evidenciado por outros autores.<sup>1,2,9,19,20</sup> Pudemos observar também que a fluorescência da dentina cariada na presença do Photogem<sup>®</sup> foi maior, principalmente na região espectral de 620nm (mesma região de emissão das porfirinas), evidenciando a incorporação de porfirina exógena (Gráfico1). Esse fato garante que a ação fotodinâmica ocorrerá no tecido dentinário onde a porfirina foi incorporada, uma vez que já é conhecido que a luz é capaz de “penetrar” no tecido<sup>29</sup> e também que para a ação ser efetiva necessitamos da presença do fotossensibilizador e da luz ao mesmo tempo.

Quando determinamos o parâmetro de incorporação do Photogem<sup>®</sup> em dentina (Gráfico2) pudemos observar que a incorporação em tecido cariado foi mais evidente na concentração PA = 1 mg/mL, provavelmente isso se deva a presença de uma maior quantidade de agregados nas concentrações mais elevadas, fato que pode dificultar a difusão da porfirina pelo tecido.<sup>3,12</sup>

Observamos nesse mesmo gráfico, a baixa incorporação de Photogem<sup>®</sup> em tecido sadio, evidenciando a seletividade da técnica, pois a reação

fotodinâmica não será efetiva nessa região. O tecido sadio apresenta uma menor susceptibilidade à difusão de moléculas por se tratar de um tecido mais bem estruturado e com maior grau de mineralização em comparação com o tecido cariado, onde a maior presença de compostos orgânicos pode facilitar a difusão do fotossensibilizador.

O mecanismo de ação do TBO também ocorre na parede celular, aumentando sua permeabilidade.<sup>21</sup> Quando o TBO foi empregado como fotossensibilizador, não observou-se evidência de um aumento da intensidade de fluorescência em uma determinada região, mas sim um aumento de intensidade do espectro como um todo.

A incorporação do TBO pela dentina sadia e cariada foi mais semelhante, já com relação ao Photogem<sup>®</sup>, a incorporação foi mais evidente no tecido cariado, o que mostra uma maior seletividade do Photogem<sup>®</sup> como agente fotossensibilizador da terapia fotodinâmica para redução bacteriana em dentina contaminada (Gráfico 3).

A análise do parâmetro de incorporação do TBO em dentina (Gráfico 4) demonstra a baixa seletividade desse corante, uma vez que há pouca variação entre a autofluorescência do tecido sadio e cariado e a fluorescência na presença do corante.

A maioria dos estudos realizados na eliminação de microrganismos bucais utilizou o TBO como agente fotossensibilizador<sup>5,6,15,22,26,27</sup> porém, como muitos deles foram realizados com microrganismos em suspensão,<sup>5,22,26,27</sup> não foi

possível observar a pigmentação residual desse corante, que podemos observar na Figura 1 b, fato que dificulta sua aplicação clínica.

Com base nos resultados observados pudemos concluir que o Photogem<sup>®</sup> apresentou uma maior incorporação pelo tecido cariado em relação ao tecido sadio, conferindo a ele uma maior seletividade em relação ao TBO, que é incorporado tanto pelo tecido sadio como pelo tecido cariado sem evidente variação. Além disso, observamos que a pigmentação residual do TBO pode ser um fator de restrição para sua aplicação clínica.

### **Referências**

1. ALFANO, R.R.; YAO, S. S. Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.60, n. 2, p. 120-122, Feb. 1991.
2. BANERJEE, A.; BOYDE, A. Autofluorescence and mineral content of carious dentine: scanning optical and backscattered electron microscopic studies. **Caries Res.**, Basel, v.32, n.3, p.219-226, May/June 1998.
3. BERTOLINI, G.; BENEDETTO, S.; DALL'ACQUA, M.; VAZZOLER, M.; JORI, G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 39, n.6, p. 811-816, 1984.
4. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.29, n.3, p.192-197, 1995.
5. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from helium-neon laser. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.38, n.6, p. 401-405, June 1993.
6. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.37, n.11, p. 883-887, Nov. 1992.
7. KIDD, E. A. M. How 'clean' must a cavity be before restoration? **Caries Res.**, Basel, v.38, n. 3, p.305-313, May/June 2004.

8. KONIG, K.; FLEMMING, G.; HIBST, R. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. **Cell. Mol. Biol.**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 1293 - 1300, Dec. 1998.
9. KONIG, K.; SCHNECKENBURGER, H.; HIBST, R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. **Cell. Mol. Biol.**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 233-239, Mar.1999.
10. KURIHARA, E.; KOSEKI, T.; GOHARA, K.; NISHIHARA, T.; ANSAI, T.; TAKEHARA, T. Detection of subgingival calculus and dentine caries by laser fluorescence. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 39, n.1, p. 59-65, Feb. 2004.
11. LUI, H.; HOOPS, L.; TOPE, W.D.; LEE, P.K.; ELMETS, C.; PROVOST, N.; CHAN, A .; HEYNDORFF, H.; SU, X.Y.; JAIN, H.; HAMZAVI, I.; McLEAN, D.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and light-emitting diodes. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.140, n.1, p.26-32, Jan. 2004.
12. MALIK, Z.; JUDITH, H.; NITZAN, Y. New trends in photobiology (invited review) bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, Lausanne, v.5, n.3-4, p. 281-293, May 1990.
13. NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 55, n.1, p. 89-96, Jan. 1992.



14. OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.12, n. 4, p. 450-458, 1992.
15. O'NEILL, J. F.; HOPE, C. K.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of Toluidine Blue. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.31, n. 2, p. 86-90, 2002.
16. SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 869-880, Aug. 2000.
17. TAUBINSKY, I. M.; ALEXANDROV, M.T.; KOZ'MA, S.Y.; CHERNI, V.V. Prospects for applying fluorescence spectroscopy to diagnose the hard tissues of a tooth. **Crit. Rev. Biomed. Eng.**, Boca Raton, v. 28, n. 5-6, p. 137-144, 2000.
18. TSAI, J.C.; CHIANG, C.P.; CHEN, H.M.; HUANG, S.B.; WANG, C.W.; LEE, M.I.; HSU, Y.C.; CHEN, C.T.; TSAI, T. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 34, n 1, p.18-24, 2004.
19. VAN DER VEEN, M. H.; TEN BOSH, J. J. Autofluorescence of bulk sound and in vitro demineralized human root dentin. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 103, n.6 , p. 375-381, Dec. 1995.
20. VAN DER VEEN, M. H.; TEN BOSH, J. J. The influence of mineral loss on the autofluorescent behaviour of in vitro demineralised dentine. **Caries Res.**, Basel, v.30, n.1, p.93-99, May/June 1996.

21. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.42, n.1, p.13-18, July 1998.
22. WILLIAMS, J.A .; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of Toluidine Blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 37, n. 3, p.190-193, May/June 2003.
23. WILLIAMS, J A; PEARSON G J; COLLES M J; WILSON M. The Photo-Activated antibacterial action of Toluidine Blue O in a collagen matrix and carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v.38, n. 6, p.530-536, Nov/Dec. 2004.
24. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, London, v. 44, n.2, p. 181-189, Apr. 1994.
25. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 75, n.4, p. 299- 306, Oct. 1993.
26. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, n. 5, p.569-574, May 1995.
27. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to kill by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 8, n.3, p.182-187, June 1993.

28. ZANIN, I.C.; GONÇALVES, R.B.; JUNIOR, A.B.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.56, n.2, p.324-330, Aug. 2005.
29. ZUP, J.R.; TEN BOSCH, J. J. Angular dependence of He-Ne laser light scattering by bovine and human dentine. **Archs Oral Biol.**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 283-291, 1991.

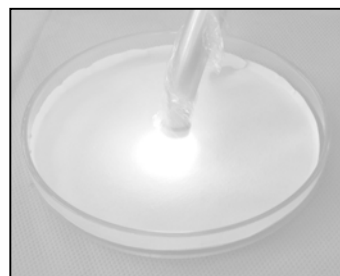
---

---

# REFERÊNCIAS

---

---



## **Referências\***

1. BEDWELL, J.; HOLTON, J.; VAIRA, D.; MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G. In vitro killing of *Helicobacter pylori* with photodynamic therapy. **Lancet**, London, v. 26, n.335, p.1287, May 1990.
2. BEM-HUR, E.; OETJEN, J.; HOROWITZ, B. Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light cause apoptosis in HIV-infected cells. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.65, n.3, p. 456-460, Mar. 1997.
3. 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.**, Oxford, v. 68, n. 3, p. 370-376, Sep. 1998.
4. BJORNDAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res.**, Basel, v. 31, n.6, p. 411-417, 1997.
5. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.29, n.3, p.192-197, 1995.
6. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from helium-neon laser. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.38, n.6, p.401-405, June 1993.

---

\* Associação Brasileira de Normas Técnicas.  
**NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

7. COLUSSI, V.C.; FEYES, D.K.; MUKTAR, H. Perspectives of photodynamic therapy for skin diseases. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol**, Basel, v.11, n. 6, p. 336-346, Nov/Dec. 1998.
8. CONSOLARO, A. **Cárie dentária – histopatologia e correlação clínica e radiográfica**. Bauru: Consolaro Editora, 1996.
9. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 883-887, Nov. 1992.
10. DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy (review). **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 90, n.12, p. 889-905, June 1998.
11. DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R.; WEISHAUP, K.R.; BOYLE, D.G. Photo radiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 55, n.1, p. 115-119, July 1975.
12. EVANS, M.D.; BAUMGARTHNER, J.C.; KHEMALEELAKUL, S.U.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide:chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 5, p.338-339, May 2003.
13. FERREIRA, J. **Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica – estudo in vivo**. 2003. 108 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina,, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

14. FRANCO, C.F.; PATARO, A.L.; SOUZA, L.C.; SANTOS, V.R.; CORTES, M.E.; SINISTERRA, R.D. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. **Artif. Organs**, Cleveland, v.27, n. 5, p. 486-491, May 2003.
15. GONZÁLES-CABEZAS, C; LI, Y.; NOBLITT, T.W.; GREGORY, R.L.; KAFRAWY, A.H.; STOOKEY, G.K. Detection of *Mutans Streptococci* in secondary carious lesions using immunofluorescent techniques and confocal laser scanning microscopy. **Caries Res.**, Basel, v. 29, n. 3, p. 198-203, 1995.
16. GRANELLI, S.G.; DIAMOND, I.; MCDONAGH, A .F.; WILSON, C.B.; NIELSEN, S.L. Photochemiotherapy of glioma cells by visible light and hematoporphyrin. **Cancer Res.**, Chicago, v.35, n.9, p. 2567-2570, Sept. 1975.
17. HUSSAIN, D.; MILLER, J.W.; KENNEY, A.G.; MICHAUD, N.; FLOTTE, T.J.; GRAGOUDAS, E.S. Photodynamic therapy and digital angiography of experimental iris neovascularization using liposomal benzoporphyrin derivative. **Ophthalmology**, Rochester, v. 104, n 8, p. 1242-1250, Aug. 1997.
18. KIDD, E.A.M.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Microbiological evaluation of caries cavity during preparation. **Caries Res.**, Basel, v. 27, n.5, p. 402-408, 1993.

19. KIDD, E.A.M.; RICKETTS, D.N.J.; BEIGHTON, D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: a clinical and microbiological study. **Br. Dent. J.**, London, v. 180, n.8, p. 287-291, Apr. 1996.
20. LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWIMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates – theory and practice. **J Photochem. Photobiol. B. Biol.**, Lausanne, v. 60, n. 1, p. 37-43, Apr. 2001.
21. LIPSON, R. L.;BALDES, E.J.;OLSEN A .M. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivate as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. **Dis. Chest.**, El Paso, v. 46, p.676-679, Dec. 1964.
22. LUI, H.; HOOBS, L.; TOPE, W.D.; LEE, P.K.; ELMETS, C.; PROVOST, N.; CHAN, A .; HEYNDORFF, H.; SU, X.Y.; JAIN, H.; HAMZAVI, I.; McLEAN, D.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and light-emitting diodes. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.140, n.1, p.26-32, Jan. 2004.
23. MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
24. MARTINETTO, P.; GARIGLIO, M.; LOMBARD, G.F.; FISCELLA, B.; BOGGIO, F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and hematoporphyrin against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Drugs Exp. Clin. Res.**, Barcelona, v. 12, n.4, p. 335-342, 1986.



25. OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.12, n. 4, p. 450-458, 1992.
26. O'NEILL, J.F.; HOPE, C. K.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of Toluidine Blue. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 31, n.2, p. 86-90, 2002.
27. PACKER, S.; BHATTI, M.; BURNS, T.; WILSON, M. Inactivation of proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. **Lasers Med. Sci.**, London, v.15, p. 24-30, 2000.
28. SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 28, n.3, p.204-210, May 1993.
29. SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
30. SMETANA, Z.; BEM-HUR, E.; MENDELSNOM, E.; SALZBERG, S.; WAGNER, P.; MALOIK, Z. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, Lausanne, v. 44, n 1, p. 77-83, June 1998.
31. SOUKOS, N.S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGH, P.M. Photodynamic effects of Toluidine Blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers Surg. Med.**, New York v.18, n 3, p. 253-259, 1996.

32. TSAI, J.C.; CHIANG, C.P.; CHEN, H.M.; HUANG, S.B.; WANG, C.W.; LEE, M.I.; HSU, Y.C.; CHEN, C.T.; TSAI, T. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 34, n 1, p.18-24, 2004.
33. VAHDATY, A.; PITT FORD, T.R.; WILSON, R.F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 9, n.6 , p. 243-248, Dec. 1993.
34. VIEIRA, R.S.; SILVA JR., I.A . Bond strength to primary tooth dentin following disinfection with a chlorhexidine solution: an in vitro study. **Pediatr. Dent.**, Chicago v. 25, n 1, p. 49-52, Jan/ Feb. 2003.
35. YANG, C.H.; LEE, J.C.; CHEN, C.H.; HUI, C.Y.; HONG, H.S.; KUO, H.W. Photodynamic therapy for bowenoid papulosis using a novel incoherent light-emitting diode device. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.149, n. 6, p. 1292-1308, Dec. 2003.
36. WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photo activated bactericidal action of Toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 37, n. 3, p.190-193, May/June 2003.
37. WILSON, B.C. Light sources for photodynamic therapy. **Photodynamic Therapy News**, v.1, p.6-8, 1998.
38. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, London, v. 44, n.2, p. 181-189, Apr. 1994.

39. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacterial in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 78, n. 5, p.569-574, May 1995.
40. WILSON, M; DOBSON, J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.16, Suppl 4, p. S414-S415, 1993.
41. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.8, n.3, p.182-187, June 1993.
42. WILSON, M.; TRACY, B.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. **J. Antimicrob. Chemother.**, London , v.37, n.2 , p.377-381, Feb. 1996.
43. WOODBURN, K.W.; FAN, Q.; KESSEL, D.; WRIGHT, M.; MODY, T.D.; HEMMI, G.; MAGDA, D.; SESSLER, J.L.; DOW, W.C.; MILLER, R.A .; YOUNG, S.W. Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v.14, n. 5, p. 343-348, Oct. 1996.

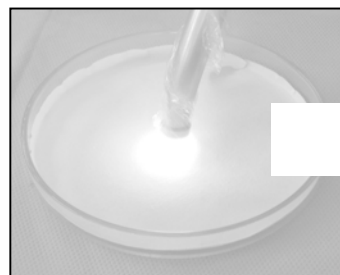
---

---

# APÊNDICE

---

---



## Metodologia Ilustrada – Capítulos 1 e 2

### 1- Obtenção dos espécimes:

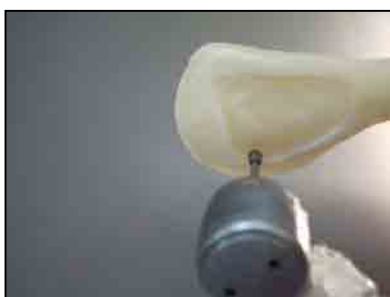


FIGURA 1: Remoção do esmalte da face vestibular do incisivo bovino utilizando fresa diamantada cônico-invertida (FG 1036G- KG Sorensen do Brasil) montada em alta-rotação.

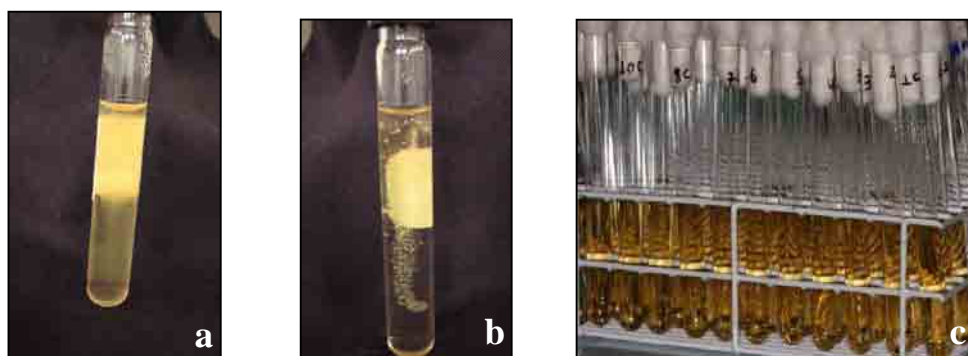


FIGURA 2: Obtenção dos espécimes utilizando broca trefina de titânio (2,7 mm de diâmetro interno, Impladonto – São Paulo, Brasil) em baixa rotação.



FIGURA 3: Espécime obtido com 2,7 mm de diâmetro.

## 2- Indução de cárie artificial:



FIGURAS 4a, 4b e 4c – A solução indutora de cárie foi preparada com uma infusão de cérebro-coração modificada (BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedo 0,5 g/100 mL, glicose 1g/100 mL e sacarose P.A . 2g /100 mL a cada 50 mL dessa solução foram acrescentados 5 mL de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC#ITAL523) -  $10^8$  UFC (a) e 5 mL de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) -  $10^8$  UFC (b), com o intuito de promover o crescimento bacteriano. Após a esterilização, cada espécime foi transferido para um tubo de cultura identificado contendo 2 mL de suspensão indutora de cárie. Esses tubos foram mantidos a  $37^{\circ}\text{C}$ , em microaerofilia, por 14 dias, sendo a suspensão trocada a cada 48 horas (c).

## 3- Terapia fotodinâmica:



FIGURA 5 - Fotossensibilizador Photogem<sup>®</sup> (Moscou, Rússia).



FIGURA 6 - Photogem<sup>®</sup> preparado em três diferentes concentrações: PA= 1mg/mL, PB= 2 mg/mL e PC= 3 mg/mL



FIGURA 7 – O Photogem<sup>®</sup> foi mantido em contato com os espécimes por 60 segundos antes da irradiação.



FIGURA 8 - Fotossensibilizador Azul de Toluidina O –TBO ( Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha)



FIGURA 9 - TBO preparado em duas diferentes concentrações: TBO A= 0,025 mg/mL e TBO B= 0,1 mg/mL



FIGURA 10 – O TBO foi mantido em contato com os espécimes por 60 segundos antes da irradiação.



FIGURA 11- As soluções fotossensibilizadoras preparadas ficaram protegidas da luz com papel alumínio com a finalidade de evitar a fotoativação pela luz ambiente.



FIGURA 12 - Protótipo com 2 LED vermelhos de luxeon com uma banda de emissão centrada em 630nm, diâmetro da ponta 0,8



cm (área de  $0,5 \text{ cm}^2$ ), intensidade de  $400 \text{ mW/cm}^2$  e potência de  $200 \text{ mW}$ .

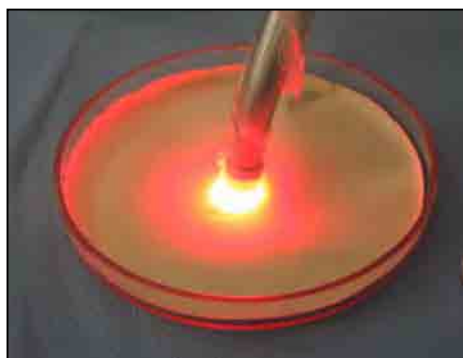


FIGURA 13 – Aplicação do LED sobre o espécime, 60s ( $D= 24 \text{ J/ cm}^2$ ) e 120 ( $D= 48 \text{ J/ cm}^2$ ).

#### 4- Análise da presença de bactérias:

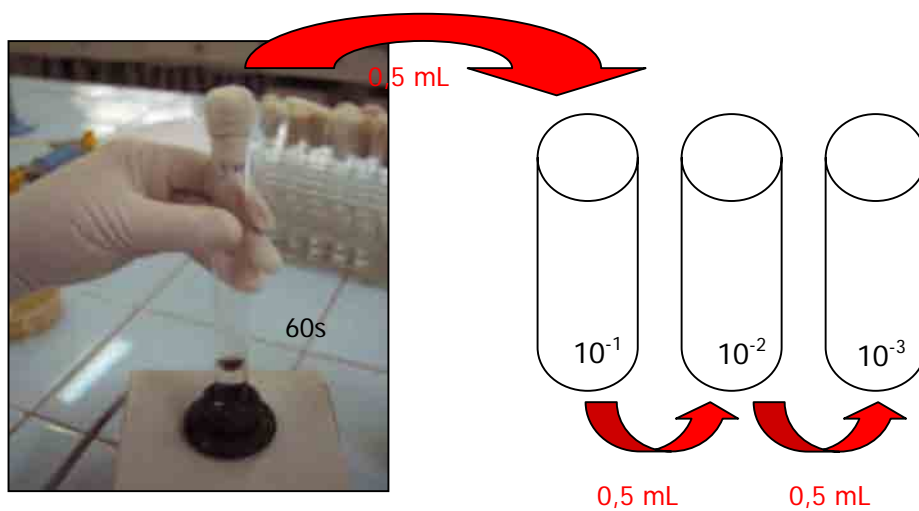
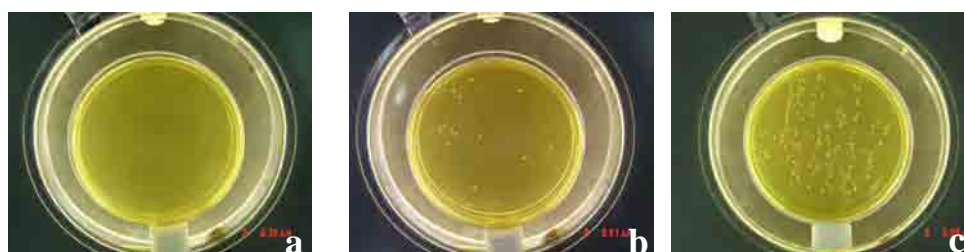


FIGURA 14 - Espécimes tratados foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina e agitados em Vortex (Heidolph, 60 Hz, Germany) por 60s. Desta solução foram retirados 0,5 mL e transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina, segundo o método das diluições sucessivas.



FIGURAS 15a e 15b - Foram plaqueados 0,1 mL de cada solução em placas de Petri contendo BHI modificado acrescido de Ágar (a) e as placas incubadas a 37<sup>0</sup>C por 48 horas, em jarras de microaerofilia (b).



FIGURAS 16a, 16b e 16c – Placas de Petri representando a ausência de bactérias (a), quantidade reduzida de colônias de bactérias (b) e presença de grande quantidade de colônias de bactérias nos espécimes (c).

### Metodologia Ilustrada – Capítulo 3



FIGURA 1 - Dentes incisivos bovinos isolados com resina epóxi e esmalte cosmético na região da coroa com cavidades preparadas em dentina na face vestibular (setas). Os dentes foram mantidos suspensos na solução indutora de cárie a fim de obtermos cárie em dentina.



FIGURA 2 – Detalhe das cavidades após a indução da cárie artificial



FIGURA 3 – Aplicação da solução fotossensibilizadora, na cavidade preparada.



FIGURA 4 – Aplicação da ponta ativa do aparato de leitura por fluorescência sobre a cavidade preparada.



FIGURA 5 – Aparato experimental utilizado para leitura por fluorescência composto por um laser de excitação (532 nm), espectrômetro, computador com programa de aquisição LightView e uma sonda tipo Y.

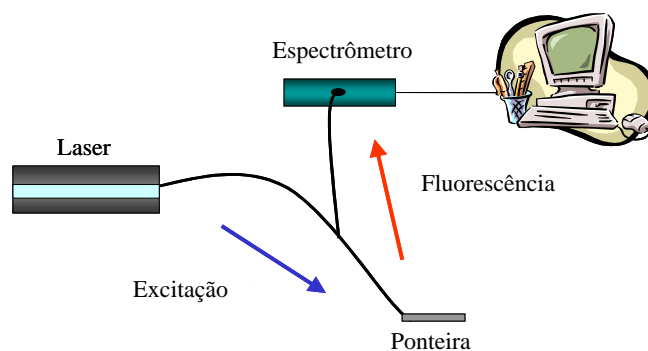


FIGURA 6- Representação esquemática do aparato utilizado para leitura por fluorescência.