

SIMONE FURGERI GODINHO VILELA

**AÇÃO DE DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES NA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**



2010

SIMONE FURGERI GODINHO VILELA

**AÇÃO DE DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

V711a Vilela, Simone Furgeri Godinho.
Ação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana /
Simone Furgeri Godinho Vilela . __ São José dos Campos : [s.n.], 2010
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São
José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Prof. Dra. Juliana Campos Junqueira

1. Azul de metileno 2. Terapia fotodinâmica . 3. Microbiologia bucal. 4. Azul de
toluidina. 5. Verde de malaquita I. Junqueira, Juliana Campos II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD17

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 05 de maio 2010.

Assinatura :

E-mail: simonefurgeri@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. Egberto Munin

Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO

São José dos Campos, 05 de maio de 2010.

DEDICATÓRIA

A Deus, que sempre iluminou meus caminhos.

Aos meus pais por todo o empenho, apoio e dedicação, durante a minha vida.

Ao meu esposo Mário por tudo que representa, pelo companheirismo, a firmeza nas horas difíceis, o apoio fundamental na estrutura de nosso lar

A minha filha Giulia razão e luz de minha vida, um amor único e especial.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

***“...Que bom que não estou sozinho.
Se você não existisse, não perceberia o quanto preciso corrigir-me.
Que bom que somos uma equipe,
que necessitamos uns dos outros,
que buscamos caminhos e alternativas para transformar e crescer...”***

Autor desconhecido

À Profa. Juliana, minha orientadora, que acreditou que poderia recomeçar a vida acadêmica após tantos anos. Por sua paciência, dedicação, amizade, por seu exemplo como pessoa e profissional, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Olavo por quem tenho uma grande admiração, um exemplo de competência na microbiologia, um modelo de professor a ser seguido por seus ensinamentos tão preciosos, meu agradecimento.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós- graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora do Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga e vice- coordenadora Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, pela resposta sempre solícita em todos os momentos.

A todos os professores pelo convívio durante a realização dos créditos pela amizade, apoio e ensinamentos.

A Profa. Luciane Dias Oliveira sempre tão atenciosa e receptiva.

A Profa. Silvia Nunes, pessoa meiga e competente, que na etapa do exame de qualificação muito contribuiu para a elaboração de minha dissertação.

Ao Prof. Egberto Munin, pelas valiosas sugestões durante a defesa de minha dissertação.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, que foram essenciais para qualidade da pesquisa.

Às secretárias da Seção da Pós Graduação pela amizade e ajuda durante este tempo.

A todos os funcionários da biblioteca pelo auxílio constante na coleta de dados e o sorriso amigo em todas as horas.

A cara colega Marta Majewski, pelos momentos de descontração, amizade e ajuda imprescindível na etapa de conclusão do experimento.

A todos colegas de Pós-Graduação do mestrado e doutorado, sempre tão pacientes comigo, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Aos alunos de iniciação Científica, em especial Fernanda e Rodnei, pela disponibilidade pelo imenso auxílio durante todo este tempo.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente colaboraram de alguma maneira e não foram citadas.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Biofilme dentário.....	22
2.2 Microrganismos.....	24
2.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
2.2.3 Enterobacteriaceae.....	26
2.2.4 <i>Candida</i> spp.....	28
2.3 Terapia fotodinâmica.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	38
4 MATERIAL E MÉTODO.....	39
4.1 Microrganismos.....	39
4.2 Preparo da suspensão de microrganismos.....	40
4.3 Fotossensibilizadores.....	40
4.4 Laser de baixa intensidade.....	41
4.5 Avaliação da ação dos fotossensibilizadores em crescimento planctônico.....	43
4.6 Avaliação da ação dos fotossensibilizadores em biofilme.....	44
4.7. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Fotossensibilizador azul de metileno.....	48
5.2. Fotossensibilizador azul de toluidina.....	50
5.3. Fotossensibilizador verde de malaquita.....	51

6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	60
8 REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	71
ANEXOS.....	77
ABSTRACT.....	79

Vilela SFG. Ação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2010.

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo avaliar a ação dos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita em conjunto com um laser de baixa intensidade sobre cepas planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Em cada grupo, foram estudadas cinco cepas clínicas e uma cepa padrão. A formação do biofilme foi realizada colocando-se a suspensão microbiana em contato com corpos-de-prova e o meio de cultura BHI por 4 dias a 37°C. Os fotossensibilizadores foram preparados nas concentrações de 3000, 1800, 600, 300, 150, 75 e 37,5 µM. Foi adicionado ao fotossensibilizador a suspensão de microrganismos para o estudo das células planctônicas e biofilme. Os ensaios foram executados utilizando-se um laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (660 nm). Os grupos controles foram radiados nas mesmas condições, entretanto não receberam fotossensibilizador. Para estudo das células planctônicas, após radiação, foram realizadas diluições e semeaduras em ágar BHI ou Sabouraud. Após incubação, foi feita a contagem de UFC/mL. Para análise do biofilme, após radiação, os corpos-de-prova foram submetidos à homogeneização ultra-sônica e as células dispersas foram semeadas em ágar BHI ou Sabouraud (37°C por 24 a 48 horas) para a contagem de UFC/corpo-de-prova. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva. A redução de UFC/mL foi de 0,4 a 6,53 log₁₀ dependente do microrganismo e fotossensibilizador testado. As concentrações mais eficazes dos fotossensibilizadores variaram entre 37,5 a 1800 µM para o azul de metileno, 37,5 a 300 µM para o azul de toluidina e 300 a 3000 µM para o verde de malaquita. A maior redução microbiana observada ocorreu com o fotossensibilizador verde de malaquita. Concluiu-se que os fotossensibilizadores estudados foram eficazes na redução dos microrganismos testados após a realização da terapia fotodinâmica.

PALAVRAS CHAVES: Terapia fotodinâmica. Azul de metileno. Azul de toluidina. Verde de malaquita. Microbiologia bucal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Filtração do azul de metileno em membrana com poros de 0,22 μm	41
Figura 2 -	Laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil).....	42
Figura 3 -	Fotossensibilização <i>in vitro</i> . Anteparo negro fosco utilizado para evitar espalhamento de luz.....	44
Figura 4 -	Calota de íris transparente com pino utilizada como corpo-de-prova.....	44
Figura 5 -	Corpos de prova em Caldo Infuso Cérebro-Coração acrescido de 5% de sacarose.....	45
Figura 6 -	Corpos de prova sendo lavados com solução fisiológica.....	46
Figura 7 -	Corpos de prova submersos nas diluições seriadas do fotossensibilizador.....	46
Figura 8 -	Corpos de prova submetidos à homogeneização (homogeneizador ultra-sônico).....	47
Figura 9 -	Dados de UFC/mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com azul de	

metileno para experimento na forma planctônica.....	49
Figura 10 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme.....	49
Figura 11 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica.....	50
Figura 12 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme.....	51
Figura 13 - Dados de UFC/ mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica.....	52
Figura 14 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> obtidos na terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme.....	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Número de ensaios para os diferentes microrganismos com crescimento planctônico e em biofilme.....	39
Quadro 2 -	Parâmetros do laser em baixa intensidade utilizado para realização da terapia fotodinâmica sobre microrganismos na forma planctônica e em biofilme.....	42
Tabela 1	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica.....	71
Tabela 2	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica.....	71
Tabela 3	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica.....	71
Tabela 4	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento	

	em biofilme.....	72
Tabela 5	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme.....	72
Tabela 6	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme.....	72
Tabela 7	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica.....	73
Tabela 8	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica.....	73
Tabela 9	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica.....	73
Tabela 10	Unidades formadoras de colônias (Log ₁₀) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme.....	74

Tabela 11	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme.....	74
Tabela 12	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme.....	74
Tabela 13	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica.....	75
Tabela 14	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica.....	75
Tabela 15	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica.....	75
Tabela 16	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Staphylococcus aureus</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme.....	76
Tabela 17	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Escherichia coli</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde	

	de malaquita para experimento em biofilme.....	76
Tabela 18	Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Candida albicans</i> após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = Por cento

AFM = Microscopia de força atômica

AIDS = *Acquired Immuno-deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AM = Azul de metileno

AT = Azul de toluidina

ATCC = *American type culture collection* (cultura pura de microrganismo)

BHI = *Brain heart infusion* (infusão cérebro coração)

cm² = Centímetro Quadrado

CO₂ = Dióxido de Carbono

CTP1 = *Cationic triporphyrin compound* (composto catiônico de triporfirina)

EDTA = *Ethylenediamine tetra acetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

GaAlAs = *Gallium aluminum arsenide* (arseneto de gálio e alumínio)

h = Hora

HAART = *Highly active antiretroviral therapy* (terapia dos anti-retrovirais altamente ativa)

He-Ne = hélio-neônio

HIV = *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

J = Joules

J/cm² = Joule por centímetro quadrado

KGy = KiloGray

LED = *Light emitting diode* (diodo emissor de luz)

mg/mL = Miligrama por mililitro

min = Minutos

mL = Mililitro

MRSA = *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* metilina resistente)

mW = Mili Watts

mW/cm² = Mili Watts por centímetro quadrado

µg/mL = Microgramas por mililitro

µL = Micro litro

µm = Micrometro

µM = Micro molar

NaCl = Cloreto de sódio

nm = Nanometro

°C = Grau Celsius

PBS = Solução fisiológica tampão fosfato

PDT = Terapia fotodinâmica

pH = Potencial hidrogênio iônico

s = Segundos

TBO = Azul de orto-toluidina

UFC/mL = Unidades formadoras de colônias por mililitro

UNESP = Universidade Estadual Paulista

VM = Verde de malaquita

VRSA = *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistente)

W = Watt

XF = *Cationic diporphyrin-based compound* (composto a base de diporfirina catiônica)

Xg = Centro de gravidade

1 INTRODUÇÃO

A resistência das bactérias aos antibióticos, devido ao seu uso inapropriado, é um dos maiores problemas da atualidade e representa um desafio para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento de pacientes infectados (Almeida et al.,2006; Benvindo et al.,2008; Dunbar et al.,2008).

O desenvolvimento da resistência microbiana pode ser atribuído a vários fatores, incluindo: prescrição inapropriada ou excessiva de antibióticos, adição generalizada de antibióticos às rações administradas aos animais, alta taxa de transmissão de microrganismos pelo aumento das viagens globalizadas, crescimento da pobreza nos países do terceiro mundo e ampla variedade de mecanismos de adaptação das células microbianas. Deste modo, tornou-se evidente a necessidade do desenvolvimento de um novo e eficiente método de controle das doenças de origem microbiana (Jori et al., 2006).

Dentro deste cenário surge a Terapia Fotodinâmica (PDT), que se baseia na administração tópica ou sistêmica de um fotossensibilizador não tóxico e sensível à luz, seguida da irradiação de baixa intensidade com luz de comprimento de onda adequado (Garcez et al., 2008). Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção do oxigênio singleto. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição da célula (Perussi, 2007).

As principais vantagens da terapia fotodinâmica podem

ser resumidas da seguinte forma: largo espectro de ação, visto que o fotossensibilizador pode agir sobre bactérias, fungos e protozoários; eficácia independente das cepas microbianas serem resistentes a antibióticos; possibilidade do desenvolvimento de protocolos que conduzam a uma extensa redução dos microrganismos com dano muito limitado ao tecido hospedeiro; falta de seleção de cepas fotoresistentes após múltiplos tratamentos; baixa probabilidade de promover mutagenicidade; disponibilidade de formulações que permitam uma pronta e específica liberação do fotossensibilizador na área infectada; uso de uma fonte de luz de baixo custo para a ativação do agente fotossensibilizador (Jori et al., 2006).

Atualmente, sabe-se que a PDT é efetiva contra vírus (Costa, 2008), bactérias e fungos (Hamblin et al., 2002), e muitos estudos sugerem o seu uso em infecções localizadas (Demidova; Hamblin; 2005, Simplício et al., 2002).

As bactérias Gram-positivas são geralmente mais susceptíveis a essa terapêutica quando comparados às espécies Gram-negativas, o que pode ser explicado pela diferença estrutural em sua parede celular (Demidova; Hamblin, 2005, Miyabe, 2007, Tegos; Hamblin, 2006). Em bactérias Gram-positivas, a porção externa da parede celular é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos se vincularem de forma eficiente e se difundir em locais sensíveis da célula. Em bactérias Gram-negativas, a estrutura da membrana externa é mais complexa, formando uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente, tornando assim difícil a penetração do fotossensibilizador (Jori et al., 2006).

As leveduras são mais resistentes à inativação fotodinâmica, pois possuem maior tamanho celular do que as bactérias. As espécies de *Candida*, por exemplo, são 25 a 50 vezes maiores do que as bactérias, contendo um grande número de alvos para PDT por célula.

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana para os

diferentes microrganismos é dependente do tipo e concentração do fotossensibilizador. Além disso, foi demonstrado que a susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e aos fotossensibilizadores torna-se reduzida quando os mesmos estão organizados em biofilme (Donnelly et al., 2007). A formação dos biofilmes oferece vantagens para os microrganismos, como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra o sistema imune do hospedeiro (Eick et al., 2004; Jorge, 2007; Wiles et al., 2008).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a ação dos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita na terapia fotodinâmica, sobre cepas planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor entendimento, a revisão de literatura encontra-se dividida em três tópicos. No primeiro tópico, serão abordados aspectos do biofilme dentário e o papel dos biofilmes nas doenças. No segundo tópico serão descritos aspectos sobre as características gerais dos microrganismos que serão alvo do estudo. No terceiro e último tópico, serão abordados aspectos sobre estudos realizados com terapia fotodinâmica.

2.1 Biofilme dentário

O biofilme é um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada. É constituído por complexos microbianos formados por populações desenvolvidas a partir de uma ou múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas ou abióticas. Vários autores definem biofilme como associações de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies sólidas (Kyaw*, 2008).

A cavidade bucal é colonizada por cerca de 1000 espécies de microrganismos e a maioria deles estão organizados sob a forma de biofilmes (Wilson, 2004).

*KYAW CM. Biofimes microbianos [plano de aula on line]. Brasília: Disponível em: www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html Acesso em: 21 set. 2008

Logo após a higienização dos dentes inicia-se a formação da película adquirida responsável pela adesão inicial do biofilme dentário (Marsh,1992). Inicialmente os microrganismos denominados colonizadores primários, se aderem a esta película através de reações físico-químicas. Em condições adequadas, os colonizadores primários multiplicam-se sobre o substrato para formar micro-colônias. Quando ocorrem mudanças nas condições ambientais no interior do biofilme em formação e o substrato existente apresenta-se coberto por bactérias responsáveis pela colonização primária, outros microrganismos tornam-se capazes de se unirem aos primários e a partir deste momento o biofilme começa a se desenvolver com múltiplas espécies (Rickard et al., 2003).

Uma característica determinante do biofilme microbiano é a comunicação entre células. Esta dinâmica da comunicação, chamada *quorum sensing*, fornece um mecanismo de regulação bacteriana com a função de modular a presença da expressão de genes de resistência aos antibióticos, facilitar o crescimento de espécies benéficas e impedir o crescimento de espécies não desejadas no biofilme (Jorge, 2007; Thomas; Nakaishi, 2006).

A formação dos biofilmes oferece vantagens para os microrganismos, como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra o sistema imune do hospedeiro (Eick et al., 2004; Jorge, 2007; Wiles et al., 2008).

Três mecanismos foram sugeridos para tentar explicar o aumento da resistência dos microrganismos do biofilme aos antibióticos, entre eles pode-se citar:

- a) dificuldade do antimicrobiano em penetrar na matriz extracelular do biofilme;
- b) pequeno crescimento das células microbianas por limitação dos nutrientes, uma vez que células com pequeno crescimento são pouco susceptíveis aos agentes antimicrobianos;

c) mudanças genéticas, como mutações e transferência de genes entre microrganismos (Thomas; Nakaishi, 2006).

2.2 Microrganismos

2.2.1 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formam esporos, são geralmente imóveis e suas células costumam apresentar-se na forma esférica ou ligeiramente alongada. (Jorge, 2006).

A espécie *Staphylococcus aureus* tem sido reconhecida como um importante patógeno humano responsável por uma grande variedade de infecções, desde moderadas infecções de pele até bacteriemias e septicemias graves (Hardy et al., 2004).

As espécies de *Staphylococcus* não são consideradas residentes da microbiota bucal humana, entretanto podem atuar como patógenos oportunistas em indivíduos submetidos à medicação sistêmica prolongada de antimicrobianos e imunossupressores. Quando presentes, encontram-se em número reduzido e são considerados como parte da microbiota transitória. Indivíduos que apresentam doença periodontal representam possíveis reservatórios dessas bactérias oportunistas na cavidade bucal (Loberto et al., 2004; Miyabe, 2007).

Dentre as infecções orais causadas por *Staphylococcus aureus* podemos destacar as infecções dento alveolares agudas, infecções da mucosa oral, osteomielites da mandíbula, queilites angulares e mucosites em pacientes idosos e com doenças sistêmicas associadas

(Smith et al., 2001).

Loberto et al. (2002) verificaram a presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal e nas bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica. Do total de pacientes, 37,50% apresentaram *Staphylococcus* spp. na bolsa periodontal e 61,36% na cavidade bucal. A presença destes microrganismos pode, segundo o autor, representar dificuldades para a manutenção do tratamento periodontal.

A capacidade de formar biofilme é um fator crucial na persistência das infecções causadas por estafilococos. Uma vez estabelecida, esta comunidade constitui um nicho de proteção que promove o crescimento e sobrevivência de bactérias em um ambiente hostil e difícil de eliminar, possivelmente devido à incapacidade de penetração dos antibióticos no biofilme (Di Poto et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2005)

O uso de antibióticos para o tratamento da doença periodontal ou outras infecções pode predispor ao aumento do número de *Staphylococcus* spp. na boca, pois estes adquirem facilmente resistência aos antibióticos, podendo resultar infecções oportunistas (Loberto et al., 2004).

O tratamento das infecções estafilocócicas é cada vez mais problemático, devido à resistência dos isolados clínicos a um número crescente de agentes antimicrobianos (Fitzpatrick et al., 2005).

Um importante mecanismo de resistência bacteriana frente às penicilinas é a produção de β -lactamases (Bennett et al., 2008; Deurenberg; Stobberingh, 2008; Dunbar et al, 2008; Miyabe, 2007; Siegel, 2008). Estudos imunológicos e de especificidade de substrato indicam que *S. aureus* produz ao menos três tipos diferentes de β -lactamases. A produção dessas enzimas torna o microrganismo resistente à penicilina e a ampicilina (Querido, 2006).

Loberto et al. (2004) avaliaram a resistência aos

antibióticos de cepas coletadas da bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. Verificou que todas as cepas de *S. aureus* testadas e 85,71% das cepas de *S. epidermidis* foram resistentes a todos antibióticos testados no trabalho.

O surgimento e a prevalência de multirresistência por cepas de *S. aureus*, bem como o aumento de infecções hospitalares graves, tem incentivado o desenvolvimento de vários novos antimicrobianos (Dunbar et al., 2008).

2.2.2 Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis ou imóveis (Jorge, 2006), que colonizam tipicamente o trato intestinal dos humanos, mamíferos e aves (Nakazato et al., 2009).

Cepas de *Escherichia coli* são encontradas geralmente no trato intestinal de indivíduos saudáveis, no entanto, em pacientes imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, essas bactérias podem causar doenças infecciosas. Cepas patogênicas de *Escherichia coli* podem causar doença no trato intestinal, como a gastroenterite, podendo ocorrer disseminação e colonização para outros nichos, incluindo sangue, sistema nervoso central e trato urinário, resultando em doença (Nakazato et al., 2009, Wiles et al., 2008).

Atualmente, *E. coli* é considerado o exemplo mais significativo de bactéria Gram-negativa relacionada com diversas doenças, devido aos seus mecanismos de patogenicidade (Nakazato et al., 2009).

As Enterobactérias apresentam variações significativas na sua capacidade de infecção. Além das características particulares de

cada espécie, o grau de virulência depende do número de microrganismos necessário para produzir infecção. A patogenicidade desses microrganismos é determinada pela habilidade de colonização do hospedeiro, potencial de penetração em superfícies mucosas, invasão e multiplicação nos tecidos e capacidade de inibir os mecanismos de defesa locais ou sistêmicas do hospedeiro (Naveen; Mathai, 2005).

A cavidade bucal pode servir como um reservatório potencial destes microrganismos. Tal fato é importante quando consideramos o ambiente hospitalar que é o local onde mais ocorrem infecções por Enterobacteriaceae. Além disso, tem ocorrido aumento no isolamento de cepas resistentes de *Klbesiella pneumoniae* e *Enterobacter*, que coincidentemente são as espécies mais isoladas da cavidade bucal humana e de amostras subgengivais (Jorge, 2007).

Santos e Jorge (1998) em amostragem aleatória e heterogênea analisaram a microbiota bucal de 100 indivíduos para verificar a prevalência de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal. A prevalência de indivíduos que apresentaram Enterobacteriaceae na cavidade bucal foi bastante elevada, correspondendo a 50% das amostras.

Em trabalho longitudinal com 116 crianças chinesas, Sedgley e Samaranayake (1994) encontraram uma média de 27,9% de prevalência oral de bastonetes entéricos gram-negativos, sendo que a família Enterobacteriaceae compreendeu cerca de 57% de todas as bactérias entéricas Gram-negativas.

Querido (2006) verificou a presença de Enterobactérias e Pseudomonas na cavidade bucal de 56% dos indivíduos submetidos à antibioticoterapia prolongada para o tratamento da tuberculose pulmonar e em 48% dos indivíduos do grupo controle.

As Enterobactérias também podem ser encontradas em canal radicular. Os bacilos entéricos não excedem mais que 5% da microbiota dos canais radiculares infectados, mas a sua permanência no

sistema de canais pode resultar em persistência da lesão periapical (Ferrari et al. 2005).

Oliveira et al. (2007) avaliaram os efeitos de soluções irrigadoras de canais radiculares sobre endotoxinas de *E. coli* de noventa e oito dentes humanos. As soluções utilizadas foram polimixina B, clorexidina, hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio, e concluíram que o hipoclorito de sódio e a clorexidina não foram eficazes na descontaminação do canal radicular.

Devido ao aumento da resistência antimicrobiana por esses microrganismos, deve-se ter muito cuidado no uso de terapias antimicrobianas empíricas. Quando a infecção está no seu estágio inicial e o microrganismo causador é tipicamente desconhecido, médicos freqüentemente escolhem antimicrobianos de largo espectro para cobrir uma ampla gama de agentes potencialmente patogênicos. Essa estratégia pode resultar em aumentos de custo, eventos adversos e resistência antimicrobiana (Thomas, 2008).

Todos estes fatos têm levado a grandes esforços na investigação para se descobrir alternativas terapêuticas antibacterianas que não desenvolvam resistência.

2.2.3 *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* encontram-se amplamente espalhadas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas no homem e em outros animais (Jorge, 2006).

Candida albicans é a espécie mais freqüentemente isolada do organismo humano, tanto como microrganismo comensal como patógeno oportunista (Cannon et al., 1995; McCullough et al., 1996; Mosca

et al. 2005).

Estudos mais antigos de *C. albicans* relacionavam-se com sua identificação, descrição, capacidade de causar lesões bucais e vaginais. Atualmente, grande parte dos trabalhos tem-se dedicado ao papel do polimorfismo de *C. albicans* como um agente patogênico e sua transição da forma comensal para oportunista (Barnett, 2008).

Até 80% dos indivíduos exibem colonização das superfícies mucosas da cavidade bucal por estes fungos na ausência de doença. Devido a uma condição debilitada do hospedeiro, esses microrganismos podem tornar-se patogênicos, sendo usualmente denominados fungos oportunistas. (Querido, 2006).

A candidose orofaríngea é uma das manifestações mais comuns de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ocorrendo em até 84% dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Teichert et al., 2002).

O amplo uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos para o tratamento de lesões fúngicas em pacientes imunossuprimidos resultou em um aumento alarmante de microrganismos resistentes a esses medicamentos. Essa resistência está associada, principalmente, com imunossupressão severa, reincidência das infecções e tempo de tratamento prolongado (Souza et al., 2006; Wilson; Mia, 1993).

Aproximadamente 81% de todos os pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) estão colonizados por cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos (Souza et al., 2006; Teichert et al., 2002). Considerando isto é necessário o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento de infecções fúngicas.

Segundo Chandra et al. (2001) mesmo com a terapia antifúngica atual, a mortalidade de pacientes com candidose invasiva, chega a 40%. A candidose invasiva está geralmente associada com colocação de dispositivos médicos que podem agir como substratos para o crescimento do biofilme fúngico. A formação de biofilme também é

crítica no desenvolvimento da estomatite protética, uma forma superficial de candidose, que afeta 65% dos indivíduos edêntulos. Apesar do uso de drogas antifúngicas no tratamento de estomatite protética, infecção geralmente é restabelecida logo após o tratamento. Estas observações clínicas enfatizam a importância da formação de biofilme tanto na candidose superficial como sistêmica e da incapacidade da atual terapia antifúngica para curar essas doenças.

2.3 Terapia fodinâmica

Há 4.000 anos os egípcios deram início a terapia fotodinâmica, através da ingestão de plantas (contendo psoralenos, furo[3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofurano-acrílico δ -lactona) e luz solar, para tratar doenças como o vitiligo (Simplício et al., 2002).

Entretanto, a primeira evidência experimental do potencial da fotossensibilização foi obtida em 1900 quando Raab, observou que a exposição ao corante acridina e luz podiam ser letais a paramécios, protozoário causador da malária. Ele postulou que este efeito era causado pela transferência de energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. A utilização da luz ou corante isoladamente não apresentava qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas juntos eles eram altamente citotóxicos (Imparato, 2005).

A primeira evidência clínica da eficácia da terapia fotodinâmica foi obtida em 1903 por Tappenier e Jesionek que realizaram estudos visando à aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores humanos, utilizando a eosina como fotossensibilizador. Embora os resultados tenham sido positivos, esse trabalho não obteve continuidade (Ferro et al., 2007; Machado, 2000; Simplício et al., 2002).

Em 1913 Meyer-Betz fez uma auto-injeção de 200 mg do que ele pensava ser hemato-porfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses (Machado, 2000; Simplício et al., 2002).

Na década de 60, Lipson, sob orientação de Schwartz, investigou o acúmulo preferencial dos corantes em tumores, implantados em camundongos e ratos, observando que a incidência de luz proporcionava regressão da doença. Devido aos resultados desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama, usando hematoporfirina D e irradiação seletiva do tumor. Assim, esse fato marcou o início da terapia fotodinâmica para o tratamento clínico do câncer (Machado, 2000; Simplício et al, 2002; Prates, 2005).

Apesar destas descobertas, o potencial da PDT contra doenças de origem microbiana não foi explorado por várias décadas, devido ao fato de alguns microrganismos, especialmente esporos bacterianos, apresentarem fraca resposta à PDT com os mais tradicionais agentes fotossensibilizadores, incluindo os corantes xantenos, acridina e porfirinas, que eram freqüentemente usados para tumores na terapia fotodinâmica. Além disso, com a descoberta dos antibióticos acreditou-se que doenças de origem bacteriana poderiam ser gradualmente reduzidas (Jori et al., 2006). Entretanto, o rápido aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, desapontou as expectativas dos profissionais da área de saúde (Ferro et al., 2007; Salmon-Divon et al., 2004; Zanin et al., 2006).

Ivanov et al.* (2000), relataram que as concentrações indicadas para os corantes fenotiazínicos não deveriam ultrapassar 0,1%,

*Ivanov KN, Titorenko VA, Shoub GM, Lepilin AV, Ovchinnikov IS, Mischenko OS, et al. Photodynamic action of laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms of oral cavity. In: Lasers in Dentistry VI; 2000 Jan 23; San Jose, CA, USA: Proc. SPIE. 2000; 3910:30 *apud* Imparato JCP. Tratamento restaurador atraumático: técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença cárie dentária. Curitiba: Editora Maio Ltda; 2005.

pois acima desta concentração, esses corantes tornam-se tóxicos e provocam o manchamento da dentina, tornando o tratamento inviável quanto a estética.

Usacheva et al. (2001) avaliaram a eficácia do azul de metileno e azul de toluidina como fotossensibilizadores sobre vários microrganismos patogênicos. Os autores utilizaram o laser de argônio com comprimento de onda de 630 nm e o laser de diodo com comprimento de onda de 664 nm com fluência variando entre 10 a 60 J/cm² e a intensidade de potência entre 50 a 100 mW. As concentrações dos corantes azul de metileno e azul de toluidina variaram de 1 a 200 µM. Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos indicaram que todos os microrganismos foram sensíveis ao laser na presença dos corantes. No entanto, o grau de redução microbiana foi dependente do tipo e concentração do corante utilizado, fluência e intensidade de potência do laser, bem como da espécie bacteriana envolvida. As bactérias Gram-positivas e *H. influenzae* foram totalmente eliminadas na concentração de corante variando entre 4-28 e 25-44 µM, respectivamente, para o azul de toluidina e azul de metileno. A completa fotodestruição das bactérias Gram-negativas foi atingida com concentrações mais altas de azul de toluidina e azul de metileno do que as utilizadas para as Gram-positivas.

Teichert et al. (2002) realizaram estudo com cepas de *Candida albicans* resistentes aos antifúngicos, coletadas de pacientes HIV-positivos. Estas cepas foram inoculadas na cavidade bucal de ratos que posteriormente foram submetidos à aplicação tópica de 1 mL do azul de metileno nas concentrações de 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500 µg/ml. Após 10 minutos da aplicação do corante, foi feita a radiação com Laser de diodo com comprimento de onda de 664 nm, potência de 400 mW, tempo de exposição de 687,5 segundos e densidade de energia de

275 J/cm². A seguir, foram realizadas culturas microbianas e eutanásia dos animais para análise histológica do dorso da língua. Os resultados obtidos mostraram que todos os grupos, sem distinção da concentração de azul de metileno utilizada, exibiram redução na população de *Candida albicans* após receberem ativação da luz. Uma completa eliminação dos microrganismos foi obtida com as concentrações de 450 e 500 µg/mL do corante. Na análise histológica, os ratos tratados com terapia fotodinâmica não apresentaram candidose, exibindo apenas uma mínima resposta inflamatória. As línguas dos ratos do grupo controle apresentaram elevado grau de candidose restrito à camada de queratina.

Núñez et al.* (2003) avaliaram o grau de manchamento do esmalte e dentina após o emprego de agentes fotossensibilizantes em dentes bovinos. Foram utilizados os fotossensibilizadores azul de toluidina, azul de metileno, cristal violeta, azuleno nas concentrações de 0,01%, 0,1%, 1% e 25%, empregados na forma líquida, em pasta ou gel. Após a colocação dos fotossensibilizadores sobre a estrutura dental, foram irradiados com laser de emissão vermelha por 180 segundos com densidade de energia de 15 J/cm². Os resultados obtidos indicaram que a concentração do fotossensibilizador é um dos principais fatores responsáveis pela dificuldade da remoção das manchas.

Maisch et al. (2005) realizaram estudo com diferentes concentrações (0 a 100 µM) e tempos de incubação (5 min, 1h e 4h) de fotossensibilizadores a base de porfirina (CTP1, XF 70, XF 73). Foram utilizadas 2 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, 1 cepa de *Staphylococcus aureus* sensível a metilicina, 1 cepa de *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina, *Escherichia coli*, queratinócitos humanos e fibroblastos. A incubação com 0,005 µM de XF

Núñez SG, Garcez AS, Souza FR, Hayek RRA, Jorge AOC, Ribeiro MS. Avaliação da penetração de agentes fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica. ABLO news. 2003;4:14 *apud* Imparato JCP. Tratamento restaurador atraumático: técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença cárie dentária. Curitiba: Editora Maio Ltda; 2005.

70 ou XF 73, seguida de iluminação, provocou 99,9% de redução do número de células de todas as cepas de *Staphylococcus*, indicando que esses corantes apresentaram alta efetividade contra as bactérias Gram-positivas, independentemente das cepas serem resistentes ou não aos antibióticos. Nesta concentração, os fotossensibilizadores também foram letais para *Staphylococcus epidermidis*, entretanto não demonstraram inativação de *Escherichia coli*. Além disso, a terapia fotodinâmica utilizada nesse trabalho não prejudicou os queratinócitos e fibroblastos.

Prates et al. (2007) investigaram os efeitos antimicrobianos do verde malaquita a 0,01% associado à irradiação laser em baixa intensidade sobre *A. actinomycescomitans* em suspensão. Esses autores analisaram também a degradação do verde de malaquita após a irradiação por meio de espectroscopia de absorção óptica. Culturas de *A. actinomycescomitans* foram irradiadas por laser diodo GaAIs (660 nm e 30 mW) na presença ou ausência do fotossensibilizador. Dois tempos de radiação foram usados: 3 e 5 minutos, levando a uma fluência de 5,4 e 9 J/cm² respectivamente. O espectro de absorção da suspensão bacteriana após a irradiação foi obtido em espectrofotômetro. O autor concluiu que *A. actinomycescomitans* pode ser morto pela radiação laser em baixa intensidade na presença do verde de malaquita. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas fluências. Somente a radiação laser não foi capaz de danificar as células bacterianas.

Zanin et al. (2005) avaliaram, *in vitro*, o efeito antimicrobiano do fotossensibilizador azul toluidina O (TBO), na terapia fotodinâmica, sobre a viabilidade e estrutura de biofilmes contendo cepas de *Streptococcus mutans*. Os biofilmes foram cultivados sobre discos de hidroxiapatita por períodos de 3, 5 e 7 dias e posteriormente foi realizada a terapia fotodinâmica utilizando os lasers He-Ne ou LED com densidade de energia variando entre 49 e 294 J/cm². Foi observada redução na viabilidade de *S. mutans* presentes no biofilme em até 99,99% quando

expostos à luz e fotossensibilizador. Os resultados mostraram que o efeito bactericida foi dependente da densidade de energia utilizada e que biofilmes mais antigos foram menos sensíveis à terapia.

Souza et al. (2006) realizaram estudo *in vitro* sobre o efeito da radiação laser na presença do azul de metileno a 0,1 mg/mL sobre várias espécies de *Candida*, e observaram redução do número de UFC/mL de 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para *C. krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*, concluindo que a fotossensibilização apresentou efeito fungicida sobre todas as espécies do gênero *Candida* estudadas.

Zanin et al. (2006) realizaram estudo para determinar os níveis de fotodestruição de biofilmes contendo cepas de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* ou *S. sanguinis* após submetê-los à terapia fotodinâmica. Os biofilmes foram cultivados em discos de esmalte por períodos de 3, 5 e 7 dias e posteriormente foi realizada a terapia fotodinâmica utilizando fotossensibilizador azul de toluidina O (0,1 mg/mL) associado ao laser diodo com densidade de energia de 85,7 J/cm². Foi analisado o número de microrganismos viáveis, a concentração de polissacarídeos insolúveis em água e perda mineral. O número de microrganismos e a concentração de polissacarídeo insolúvel em água aumentaram com a idade do biofilme. Foi observada uma redução significativa (aproximadamente 95%) na viabilidade de *S. mutans* e *S. sobrinus* após a fotossensibilização, sendo que a redução de *S. sanguinis* foi superior a 99,9%.

Trabalhos recentes sobre terapia fotodinâmica tem se dedicado ao estudo em biofilmes comparado-os com os resultados obtidos em células planctônicas e as alterações estruturais que ocorrem nos microrganismos após esta terapia.

Sharma et al. (2008) realizaram estudo *in vitro* sobre a inativação de bactérias em biofilmes. Para este estudo foram utilizadas cepas de *Staphylococcus epidermidis* e uma cepa de *Staphylococcus*

aureus resistente à meticilina. Foi utilizado o corante azul de toluidina na concentração de 10 a 80 μM e um laser diodo com um comprimento de onda de 640 nm e intensidade da fonte de luz de 42 mW/cm². Observou-se significativa inativação de células quando os biofilmes foram expostos ao laser e ao corante simultaneamente. O efeito encontrado foi dependente da dose utilizada, sendo que a melhor concentração foi de 40 μM . A Microscopia de Laser Confocal sugeriu danos à membrana da célula bacteriana dos biofilmes tratados com a terapia fotodinâmica. A microscopia eletrônica de varredura forneceu provas do rompimento da estrutura do biofilme e uma diminuição no número de células. Além disso, foi demonstrado que o tratamento dos biofilmes com EDTA seguido pela PDT aumentou a eficácia dessa terapia em *S. epidermidis*, mas não em *S. aureus*.

Sahu et al. (2009) estudaram alterações morfológicas induzidas pela terapia fotodinâmica em cepas de *S. aureus* e *E. coli*, utilizando Microscopia de Força Atômica (AFM). As imagens demonstraram que a PDT com azul de toluidina causou alterações na morfologia de *S. aureus* e *E. coli*. Nas cepas de *S. aureus*, a terapia fotodinâmica resultou em perda de contato entre a parede e a membrana celular, sem alterações significativas nas dimensões da célula. Para *E. coli*, houve redução na altura das células e achatamento das bactérias. Estes resultados indicam danos à membrana citoplasmática e redução do volume celular devido à perda de material citoplasmático. A perda de conteúdo intracelular foi mensurada utilizando espectrofotometria de absorção, tendo sido maior e mais rápida nas cepas de *E. coli* em comparação com *S. aureus*. Os resultados sugerem que com a imagem de AFM é possível distinguir a ação membranolítica da terapia fotodinâmica sobre células Gram-positivas e Gram-negativas.

Fontana et al. (2009) compararam os efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismos na fase planctônica e em biofilme. Os microrganismos foram obtidos a partir de coletas de amostras de biofilme

dental de 10 indivíduos com periodontite crônica. Suspensões de microrganismos foram fotossensibilizadas com azul de metileno (25 µg/mL) por 5 min e luz vermelha. Em outro experimento, biofilmes formados *in vitro* foram sensibilizados com 25 ou 50 µg/mL de azul de metileno e expostos à luz vermelha. O resultado obtido demonstrou que a terapia fotodinâmica eliminou cerca de 63% das bactérias presentes em suspensão. Em contrapartida, nos biofilmes, a terapia fotodinâmica teve menor efeito sobre a viabilidade das bactérias (cerca de 32%).

Zolfaghari et al. (2009) realizaram estudo em feridas de ratos utilizando o corante azul de metileno com efeito antimicrobiano sobre cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Para o experimento foi utilizada uma densidade de energia de 360 J/cm² (670 nm) na presença de 100 µg/mL de azul de metileno, o que levou a uma redução de 25 vezes o número viável de microrganismos nas feridas. Os resultados deste estudo demonstram que a PDT é eficaz na redução destes microrganismos *in vivo*.

Junqueira et al. (2009) induziram candidose oral na língua de 72 ratos e, posteriormente, realizaram a Terapia Fotodinâmica. Foi utilizado para este experimento um laser com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 26 J/cm² e 0,1 mg/mL de azul de metileno. Os ratos foram sacrificados imediatamente, 1 ou 5 dias após o tratamento, para análise microscópica do dorso da língua. Verificou-se que o grupo tratado com PDT, apresentou menos alterações epiteliais e uma menor resposta inflamatória crônica quando comparados ao grupo controle, concluindo-se que a PDT reduziu a gravidade das lesões fúngicas *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi determinar a ação dos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita, em diferentes concentrações, na terapia fotodinâmica, sobre cepas planctônicas e biofilmes formados por de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas 6 cepas de *Staphylococcus aureus*, 6 cepas de *Escherichia coli* e 6 cepas de *Candida albicans*. Das 6 cepas de cada microrganismo, uma cepa foi padrão e 5 cepas foram clínicas. As cepas padrão utilizadas foram *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 25922) e *C. albicans* (ATCC 18804). As cepas clínicas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP, tendo sido isoladas da cavidade bucal humana. Todas as cepas de microrganismos foram submetidas a diferentes condições experimentais conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Número de ensaios para os diferentes microrganismos com crescimento planctônico e em biofilme.

μM	Corante	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		Total
		Planct.	Biofilme	Planct.	Biofilme	Planct.	Biofilme	
3000	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
1800	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
600	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
300	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
150	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
75	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
37,5	AM / AT/ VM	18	18	18	18	18	18	108
Controle		6	6	6	6	6	6	36
Total		132	132	132	132	132	132	792

AM: azul de metileno; AT: azul de toluidina; VM: verde de malaquita

4.2 Preparo da suspensão de microrganismos

A partir de cada cepa, foi preparada suspensão padronizada de microrganismo contendo 10^6 células/mL. Para o preparo dessa suspensão, as cepas de *S. aureus* foram cultivadas em ágar Manitol (Difco, Detroit, EUA) e as cepas de *E. coli* em ágar MacConkey (Difco, Detroit, EUA) por 48 h a 37°C. A seguir, cada microrganismo foi semeado em caldo Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion* - Difco, Detroit, EUA) e incubado a 37°C por 18 h. As cepas de *C. albicans* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas a 37°C por 48 h. Após esse período, esse microrganismo foi cultivado em caldo Sabouraud e incubado a 37°C por 16 h.

O crescimento de cada microrganismo foi centrifugado a 1300 Xg durante 10 min, desprezando-se o sobrenadante e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%).

Esse procedimento foi repetido e a contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Foi utilizado comprimento de onda e densidade óptica, respectivamente, de 490 nm e 0,374 para *S. aureus*, 590 nm e 0,324 para *E. coli*, 530 nm e 0,284 para *C. albicans*.

4.3 Fotossensibilizadores

Foram utilizados os fotossensibilizadores azul de metileno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), azul de orto-toluidina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e verde de malaquita (Synth, São Paulo, Brasil). A solução de cada corante foi preparada pela dissolução do pó em solução fisiológica de NaCl (0,85%) na concentração de 3000 µM. Essas soluções foram esterilizadas por filtração em membrana com poros de diâmetro de

0,22 μm (MFS, Dublin, EUA). (Figura 1)

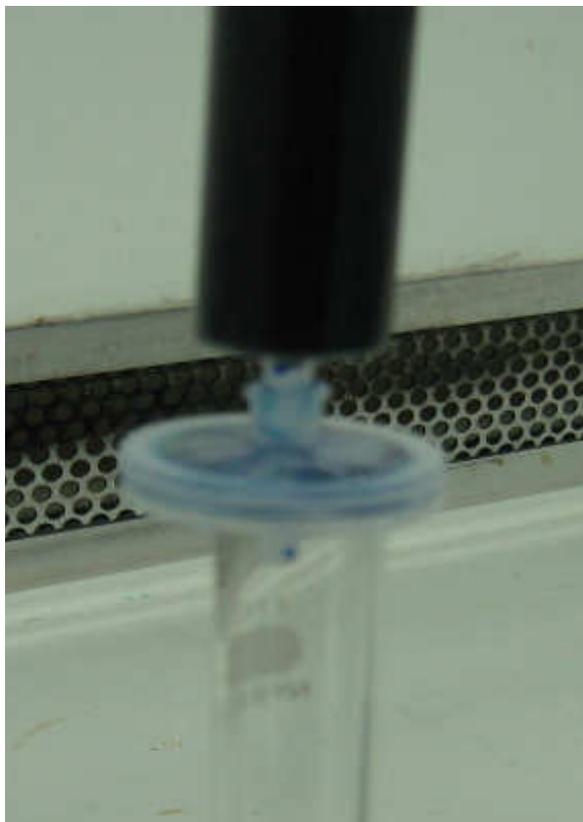


Figura 1 - Filtração do azul de metileno em membrana com poros de 0,22 μm .

4.4 Laser de baixa intensidade

Para fotossensibilização dos corantes foi utilizado um laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esses fotossensibilizadores (Figura 2).



Figura 2 - Laser de Arseneto de Gálio Alumínio (PhotonLase III, DMC, São Carlos, Brasil).

Os parâmetros do laser utilizado para a terapia fotodinâmica dos microrganismos na forma planctônica e em biofilme estão demonstrados no Quadro 2. Para o estudo dos microrganismos em crescimento planctônico foi utilizada placa de microtitulação de 96 poços que determinou uma área de irradiação do laser de $0,38 \text{ cm}^2$ e para o estudo dos microrganismos em biofilme a área de irradiação do laser foi coincidente com a do corpo de prova ($0,94 \text{ cm}^2$).

Quadro 2 - Parâmetros do laser em baixa intensidade utilizado para realização da terapia fotodinâmica sobre microrganismos na forma planctônica e em biofilme.

Laser	Cepas planctônicas	Biofilme
Potência	100 mW	100 mW
Energia	7,6 J	18,8 J
Tempo de exposição	76 s	188 s
Área irradiada	$0,38 \text{ cm}^2$	$0,94 \text{ cm}^2$
Densidade de energia	20 J/cm^2	20 J/cm^2

4.5 Avaliação da ação dos fotossensibilizadores em crescimento planctônico

Para avaliação da ação dos fotossensibilizadores em diferentes concentrações, foram utilizadas diluições seriadas do fotossensibilizador preparadas em poços da placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) contendo solução fisiológica tampão fosfato (PBS), de forma a representarem 100% (3000 μM), 60% (1800 μM), 20% (600 μM), 10% (300 μM), 5% (150 μM), 2,5% (75 μM) e 1,25% (37,5 μM) da concentração original. Após o preparo das diluições, 100 μL de cada diluição foram transferidos para a placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) para a realização da fotossensibilização *in vitro*, de acordo com a metodologia de Souza et al. (2006).

A seguir, foram acrescentados 100 μL da suspensão padronizada de cada cepa de microrganismo testada. As placas contendo as amostras foram agitadas durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado por Laser de acordo com o item 4.4.(Figura 3). Após a irradiação, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} e 10^{-4} e alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram semeados em placas de ágar Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*- Difco, Detroit, EUA) nos ensaios de *S. aureus* e *E. coli* e ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) nos ensaios com *C. albicans*. Os ensaios contendo *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. Após período de incubação de 24 h para cepas de *S. aureus* e *E. coli* e 48 h para cepas de *C. albicans* foi realizada a contagem do número de colônias para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto não recebeu fotossensibilizador.

Todo experimento foi realizado no escuro em câmara de fluxo laminar com auxílio de um anteparo negro fosco para evitar espalhamento de luz.

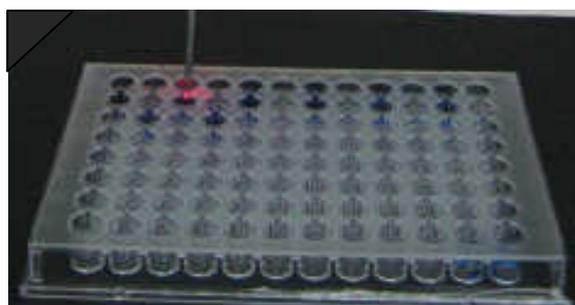


Figura 3 - Fotossensibilização *in vitro*. Anteparo negro fosco utilizado para evitar espalhamento de luz.

4.6. Avaliação da ação dos fotossensibilizadores em biofilme

Para formação do biofilme, foram utilizados como corpos-de-prova calotas de íris transparente com pino para confecção de prótese ocular (Clássico, São Paulo, Brasil) medindo 11 mm de diâmetro. (Figura 4). Os corpos-de-prova receberam duas camadas de esmalte para unhas (Colorama, São Paulo, Brasil), no pino e na parte plana, com exceção da superfície convexa.



Figura 4 - Calota de íris transparente com pino utilizada como corpo-de-prova

Os corpos-de-prova esterilizados foram colocados com a superfície sem esmalte para cima, com auxílio de pinça estéril, nas primeiras fileiras de placas de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) contendo 2 mL de Caldo Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*-Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de sacarose (Figura 5). Cada poço da placa contendo um corpo-de-prova e Caldo BHI foi inoculado com 100 μ L da suspensão microbiana. As placas foram mantidas incubadas em estufa a 37°C por 4 dias. O microrganismo foi inoculado uma única vez e o caldo BHI acrescido de 5% de sacarose foi trocado a cada 48 h.

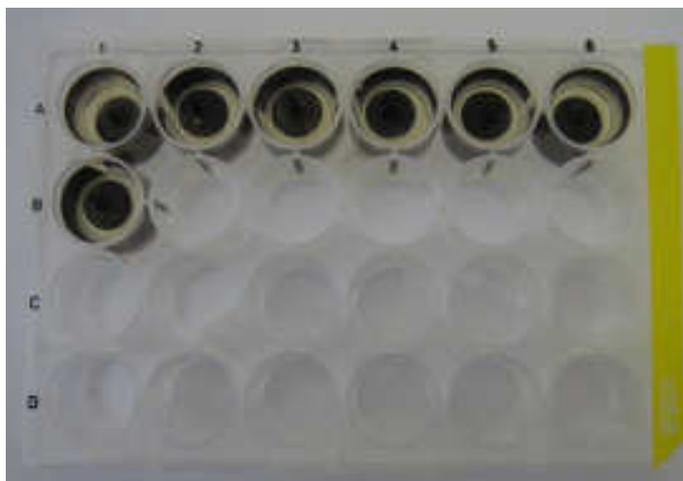


Figura 5 - Corpos de prova em Caldo Infuso Cérebro-Coração acrescido de 5% de sacarose

Após o período de incubação, os corpos-de-prova foram transferidos para os poços das próximas fileiras contendo 2 mL de solução fisiológica esterilizada, as placas foram agitadas por 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Esse processo de lavagem foi realizado 2 vezes a fim de remover as células não aderidas aos corpos-de-prova (Figura 6).

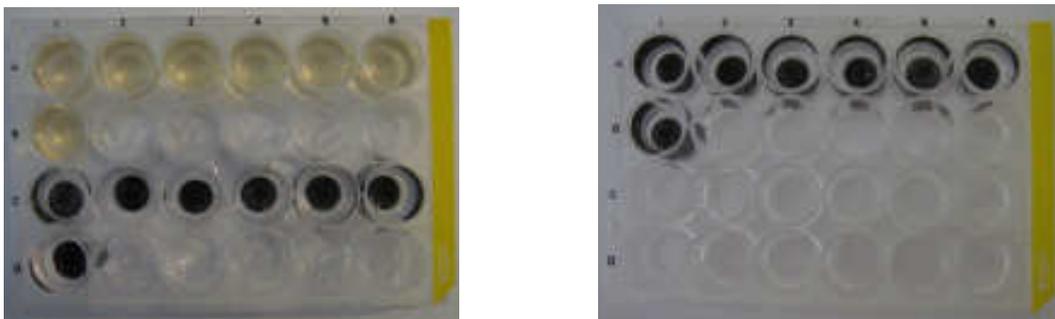


Figura 6 - Corpos de prova sendo lavados com solução fisiológica.

Após a lavagem, os corpos-de-prova foram transferidos para os poços das próximas fileiras da placa de cultura de células, onde foram submersos nas diluições dos fotossensibilizadores conforme descrito no item 4.5 (Figura 7), sendo então agitados por 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Posteriormente, os corpos-de-prova foram transferidos para os poços das próximas fileiras e irradiados, com as placas abertas, com laser em baixa intensidade nos parâmetros descritos no item 4.4.

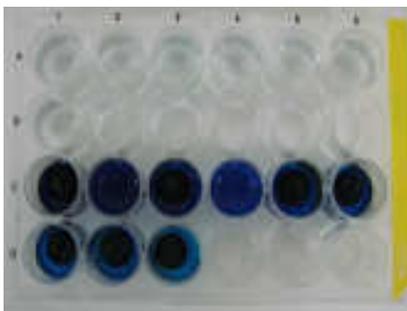


Figura 7 - Corpos de prova submersos nas diluições seriadas do fotossensibilizador

O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto não recebeu fotossensibilizador.

Todo experimento foi realizado no escuro em câmara de fluxo laminar com auxílio de um anteparo negro fosco para evitar espalhamento de luz.

Após a radiação com laser, cada corpo de prova foi

colocado em tubo falcon contendo 10 mL de solução fisiológica esterilizada, e homogeneizado por 30 segundos, utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200, Bandelin Eletronic) com potência de 50 W (Figura 8). A partir da solução obtida (10^{-1}), foram realizadas diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}) da suspensão do biofilme de cada corpo-de-prova, das quais alíquotas de 100 μ L foram semeadas em placas de Petri contendo de ágar Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*- Difco, Detroit, EUA) para os ensaios de *S. aureus*, *E. coli* e ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) para os ensaios com *C. albicans*. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h para cepas de *S. aureus* e *E. coli* e 48 h para cepas de *C. albicans*. A seguir, as placas contendo até 300 colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por superfície do corpo de prova (UFC/cm²).



Figura 8 - Corpos de prova submetidos à homogeneização

4.7. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva utilizando-se o software Minitab (Inc. PA,USA).

5 RESULTADOS

A terapia fotodinâmica com os fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita promoveu uma redução de UFC/mL ou UFC/cm² (Log₁₀) em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas.

De acordo com os parâmetros do laser definidos para este trabalho foi encontrada a concentração mais eficaz do fotossensibilizador, que variou de acordo com o tipo de fotossensibilizador utilizado, espécie de microrganismo e a forma de crescimento microbiano (planctônico e biofilme). Para facilitar o entendimento, os resultados obtidos foram demonstrados de acordo com o fotossensibilizador utilizado.

5.1 Fotossensibilizador azul de metileno

Os resultados obtidos através da Análise Descritiva para os experimentos na forma planctônica dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* estão apresentados, respectivamente, no Apêndice A e Figura 9.

Houve uma redução em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração mais eficaz foi a de 37,5 µM. As reduções observadas foram na ordem de 1,37 para *S. aureus*, 0,57 para *E. coli* e 0,63 para *C. albicans*.

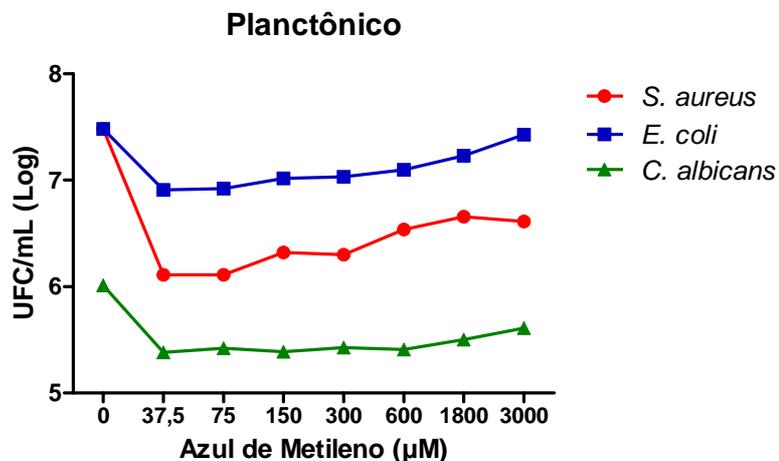


Figura 9 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica.

Os resultados obtidos para os experimentos em biofilme estão apresentados, respectivamente, no Apêndice B e na Figura 10.

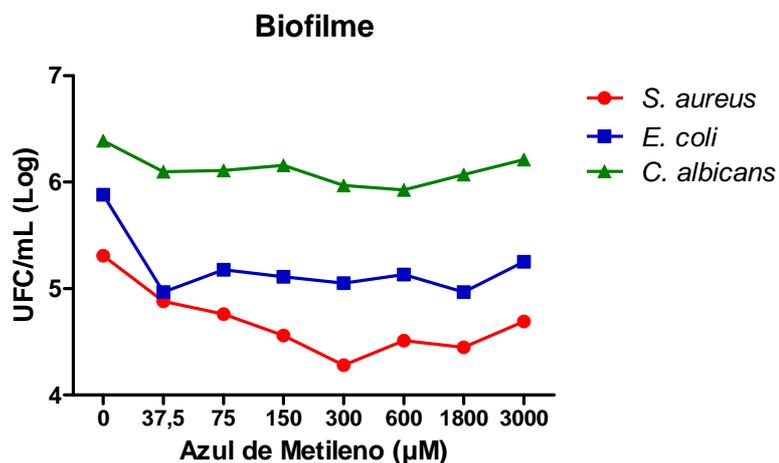


Figura 10 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme.

Houve uma redução em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas que foram menores quando comparados aos experimentos na forma planctônica, sendo que a concentração mais

eficaz variou para cada microrganismo. Para *S. aureus*, a concentração mais eficaz foi 300 μM , *E. coli* 1.800 μM e *C. albicans* 600 μM . Os resultados obtidos através da análise descritiva estão nas Tabelas 4, 5 e 6. As reduções foram na ordem de 1,03 para *S. aureus*, 0,9 para *E. coli* e 0,46 para *C. albicans*

5.2 Fotossensibilizador azul de toluidina

Os resultados obtidos através da Análise Descritiva para os experimentos na forma planctônica dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* estão apresentados, respectivamente no Apêndice C e Figura 11. Houve uma redução em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração mais eficaz foi a de 37,5 μM para *E. coli* e 75 μM para *S. aureus* e *C. albicans*. As reduções foram na ordem de 1,75 para *S. aureus*, 0,77 para *E. coli* e 0,89 para *C. albicans*.

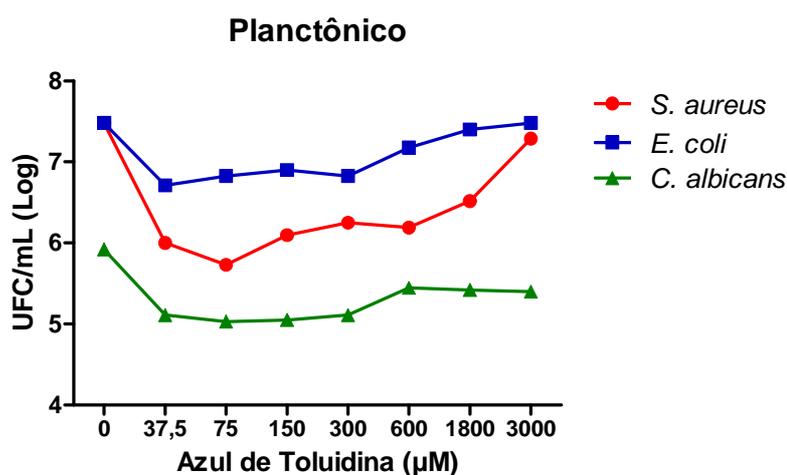


Figura 11 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica

Para os experimentos realizados em biofilme houve uma redução menor em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração mais eficaz variou para cada microrganismo. Para *S. aureus* e *E. coli* a concentração mais eficaz foi 150, e para *C. albicans* foi de 300 μM .

Os resultados obtidos através da análise descritiva estão no Apêndice D e Figura 12. As reduções foram na ordem de 1,05 para *S. aureus*, 0,73 para *E. coli* e 0,80 para *C. albicans*.

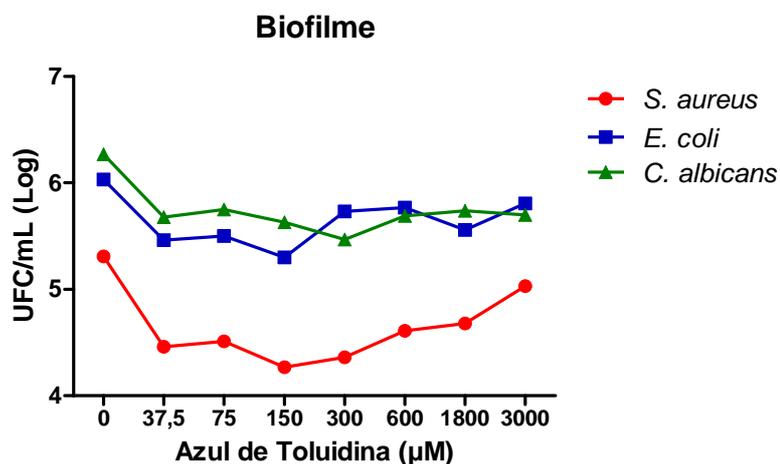


Figura 12 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme.

5.3 Fotossensibilizador verde de malaquita

Os resultados obtidos através da Análise Descritiva para os experimentos na forma planctônica dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* estão apresentados no Apêndice E e Figura 13.

Houve uma redução em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração mais eficaz foi a de 3000 μM para *S. aureus* e *E. coli* e 600 μM para *C. albicans*. As

reduções foram na ordem de 1,69 para *S. aureus*, 6,53 para *E. coli* e 0,4 para *C. albicans*.

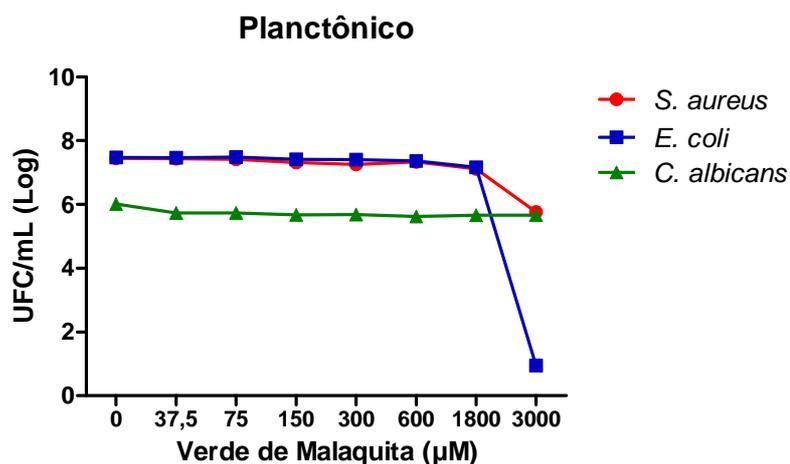


Figura 13 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica

Para os experimentos em biofilme os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.

Houve uma redução em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração mais eficaz variou para cada microrganismo, 3000 µM para *S. aureus* e *E. coli* e 300 µM para *C. albicans*

Os resultados obtidos através da análise descritiva estão no Apêndice F. As reduções em log foram de 1,63 para *S. aureus*, 4,06 para *E. coli* e 0,7 para *C. albicans*.

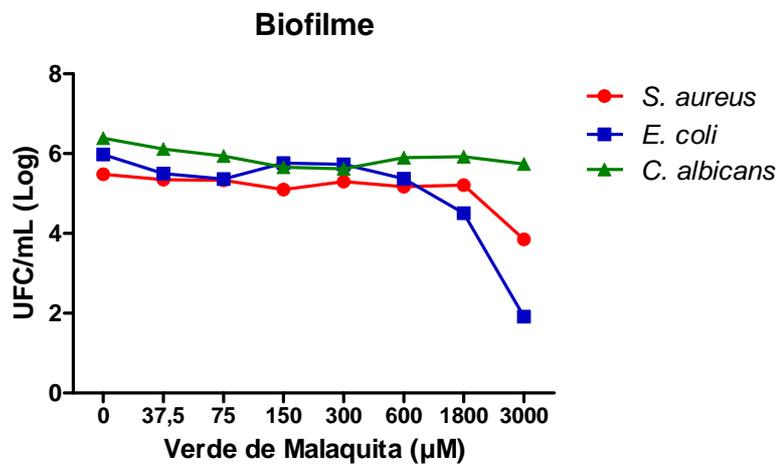


Figura 14 - Dados de UFC/mL (Log_{10}) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* obtidos na terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* podem ser reduzidos pela associação do fotossensibilizador azul de metileno, azul de toluidina ou verde de malaquita com laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 660 nm e densidade de energia de 20 J/cm², tanto na forma planctônica como em biofilme.

Em estudo semelhante com células planctônicas, Souza et al. (2010) também observaram redução de UFC/mL para os três fotossensibilizadores na concentração de 374 µM de azul de metileno, 306 µM de azul de toluidina e 365 µM de verde de malaquita em cepa padrão de *C. albicans*.

O Azul de Metileno pertence ao grupo dos corantes fenotiazínicos, eficazes agentes fotossensibilizantes para a inativação de organismos patogênicos, incluindo vírus, bactérias e leveduras (Usacheva et al., 2001). É usado como um corante antimicrobiano e marcador cirúrgico, sem causar toxicidade humana (Wainwright, 1998). Devido à baixa toxicidade, aceitação no campo médico e potencial antimicrobiano fotoativo, o azul de metileno é um fotossensibilizador indicado para terapêutica antifúngica (Teichert et al., 2002).

Dentro dos resultados obtidos neste estudo, a concentração mais eficaz na forma planctônica para o azul de metileno foi de 37,5 µM, tanto para cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Para os experimentos com biofilme, observou-se a necessidade de concentrações mais elevadas de corantes, que variaram entre 300 a 1800 µM, dependendo do microrganismo testado.

Para redução microbiana de *S. aureus*, a concentração do azul de metileno foi oito vezes maior nos experimentos em biofilme em

relação aos experimentos com células planctônicas. Quando foram realizados experimentos com cepas de *E. coli* e *C. albicans*, o aumento foi ainda maior, cerca de quarenta e oito vezes e dezesseis vezes respectivamente.

Fontana et al. (2008) realizaram estudo comparativo entre biofilmes e microrganismos planctônicos, isolados de biofilmes subgingivais de pacientes com periodontite crônica. Esses autores verificaram que na fase planctônica, a associação do fotossensibilizador azul de metileno (12,5 µg/mL) com laser na densidade de energia de 30 J/cm² obteve reduções de 63% de UFC/mL, enquanto que para conseguir uma redução microbiana no biofilme de 32%, na mesma densidade de energia, a concentração do fotossensibilizador foi quatro vezes maior. De acordo com Eick et al. (2004) e Witte et al. (2008), em biofilmes os microrganismos estão organizados apresentando vantagens como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos.

No presente estudo, o uso do azul de metileno associado ao laser de baixa intensidade com densidade de energia de 20 J/cm² para experimentos na forma planctônica apresentou uma redução em Log₁₀ de 1,37 para *S. aureus*, 0,57 para *E. coli* e 0,63 para *C. albicans*. Entretanto, alguns trabalhos na literatura obtiveram maior ação antimicrobiana com a fotossensibilização utilizando o azul de metileno associado a uma fonte de luz.

Usacheva et al. (2001) mostraram redução bacteriana significativa em todos os microrganismos estudados na concentração que variou de 1 a 200 µM de azul de metileno, utilizando o laser de argônio com comprimento de onda de 630 nm e o laser de diodo com comprimento de onda de 664 nm, com fluência variando entre 10 a 60 J/cm² e a intensidade de potência entre 50 a 100 mW.

Tubby et al. (2009) utilizando 20 µM de azul de metileno associado à luz laser de 665 nm, sobre cepas de *S. aureus* metilina

resistentes obtiveram uma redução de 4 log quando utilizaram uma densidade de energia 1,93 J/cm² e 6 log com 9,65 laser J/cm².

Souza et al. (2010), no estudo com cepas de *C. albicans*, conseguiram uma redução de UFC/mL (Log) de 0,56 para a densidade de energia de 15,8 J/cm², 0,82 para 26,3 J/cm² e 2,71 para 39,5 J/cm². Carvalho et al. (2009), utilizando azul de metileno na concentração de 150 µM, observaram redução de 80 a 90% de *C. albicans*, após irradiação com laser de diodo na potência de 0,035 W, comprimento de onda de 684 nm e densidade de energia de 28 J/cm².

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura em relação ao uso do fotossensibilizador azul de metileno para redução de microrganismos em biofilmes. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que nos experimentos com biofilmes foram conseguidas reduções na ordem de 1,03 para *S. aureus*, 0,9 para *E. coli* e 0,46 para *C. albicans*.

Esses dados estão de acordo com o estudo de Zolfaghari et al. (2009), que realizaram irradiação de feridas de ratos contaminadas com *S. aureus* metilicina resistentes. Foi utilizado laser em baixa intensidade (670 nm), com densidade de energia de 360 J/cm², na presença de 300 µM de azul de metileno, observando redução de 1,40 log₁₀ nas feridas realizadas por excisão e 1,15 log₁₀ nas feridas com escarificações superficiais.

O fotossensibilizador azul de toluidina, outro corante utilizado neste estudo, é um fenotiazínico catiônico que tem sido amplamente avaliado na literatura para a inativação de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sahu, 2009).

Dentro dos resultados obtidos no presente estudo, a concentração mais eficaz do azul de toluidina sobre microrganismos planctônicos variou entre 37,5 a 75 µM dependendo do microrganismo testado. Para os experimentos com biofilme, observou-se a necessidade

de concentrações mais elevadas de corantes, que variaram entre 150 a 600 μM dependendo do microrganismo testado.

Sahu et al. (2009) realizaram estudo com cepas de *S. aureus* e *E. coli*, utilizando o fotossensibilizador azul de orto-toluidina e verificaram que as bactérias Gram-positivas foram mais fotossensíveis do que Gram-negativas. Esses resultados concordam com o presente trabalho, no qual foi encontrada redução de UFC/mL (Log) de 1,75 para *S. aureus* e 0,77 para *E. coli*.

Souza et al. (2010) obtiveram maiores reduções de UFC/mL (Log_{10}) para cepa ATCC de *Candida albicans* com o fotossensibilizador azul de toluidina. A redução observada foi de 1,19 para o laser com comprimento de onda de 660 nm e densidade de energia de 26,3 J/cm^2 . Neste trabalho, a redução encontrada foi de 0,89, entretanto a densidade de energia do laser (660 nm) utilizado foi de apenas 20 J/cm^2 . Vários trabalhos na literatura demonstraram que quanto maior é a densidade de energia aplicada, maior é o percentual de morte microbiana observado (Sharma et al., 2007; Donnelly et al., 2007).

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura relacionados com biofilmes e fotossensibilizador azul de toluidina. Os resultados obtidos neste trabalho, demonstraram que nos experimentos com biofilmes, o fotossensibilizador azul de toluidina conseguiu reduções de 1,05 para *S. aureus*, 0,73 para *E. coli* e 0,80 para *C. albicans*.

Sharma et al. (2008) realizaram PDT em biofilmes formados por *S. aureus* e *S. epidermidis*, utilizando azul de toluidina na concentração de 40 μM associado à luz com comprimento de onda de 640 nm e densidade de energia de 25 a 200 J/cm^2 . Foi verificado que para densidade de energia de 25 J/cm^2 , a redução microbiana de *S. aureus* foi de 0,5 Log. Avaliando os resultados obtidos neste trabalho com a concentração de 150 μM (concentração mais eficaz para os experimentos de biofilme com *S. aureus*), verifica-se uma redução semelhante à citada por Sharma et al. (2008).

O corante verde malaquita, também estudado neste experimento, é utilizado como evidenciador de biofilme bacteriano para orientação de higiene oral em pacientes portadores da doença periodontal e para quantificação profissional do índice de biofilme. Apresenta uma grande facilidade de trânsito pela membrana celular, tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas (Prates, 2005).

Dentro dos resultados obtidos neste estudo, a concentração mais eficaz do fotossensibilizador verde de malaquita, para os microrganismos em crescimento planctônico, variou entre 600 a 3000 μM , dependendo do microrganismo e do tipo de experimento realizado.

Na literatura existem poucos trabalhos que avaliaram este fotossensibilizador na terapia fotodinâmica. Entre os corantes analisados neste estudo, os melhores resultados foram obtidos com o fotossensibilizador verde de malaquita nos experimentos com *E. coli*. As reduções foram na ordem 6,53 Log_{10} para microrganismos na forma planctônica e 4,06 para microrganismos com biofilmes.

Para *S. aureus* houve redução de 1,69 para cultura planctônica e 1,63 para biofilme. Em relação a *C. albicans*, foi observada redução de 0,4 para planctônico e 0,7 para biofilme.

Tanto na forma planctônica como em biofilme, foi verificada uma inativação total do número de microrganismos para várias cepas de *S. aureus* e *E. coli* na concentração de 3000 μM .

Brovko et al. (2009) investigaram os efeitos de vários corantes, entre eles o verde malaquita, para sanitização na indústria alimentícia. Foi realizada terapia fotodinâmica sobre cepas de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), Gram-positivas (*Bacillus* spp. e *Listeria monocytogenes*) e fungos (*Saccharomyces cerevisiae*). Esses autores testaram na forma planctônica, diferentes concentrações do verde de malaquita, que variaram de 15 a 15.000 μM , sob a ação de uma luz branca. Foi verificado que o fotossensibilizador verde de malaquita eliminou bactérias

Gram-positivas sob iluminação, mas não foi encontrado efeito significativo contra bactérias Gram-negativas e fungos. As reduções para *E. coli* foram de 0,09 Log₁₀ para 15 µM, 0,05 para 150 µM e 0,69 para 15.000 µM.

O trabalho realizado por Prates et al. (2007), com o fotossensibilizador verde malaquita combinado com laser AsGaAl (660 nm e 9 J/cm²), levou a uma redução de 2-3 log₁₀ de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Através dos dados obtidos no presente trabalho, foi verificado que os corantes fenotiazínicos, azul de metileno e azul de toluidina, apresentaram melhores resultados em PDT quando foram utilizados em concentrações mais baixas. Para o fotossensibilizador verde de malaquita, ao contrário, foram conseguidos melhores resultados em PDT com maiores concentrações de fotossensibilizador. Segundo Usacheva et al. (2003), o azul de metileno e azul de toluidina são corantes metacromáticos, que em determinadas circunstâncias, tais como o aumento da concentração do corante, ou a presença de polímeros aniônicos e sais inorgânicos, podem levar à mudanças das interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas do corante. Essas interações causam agregação do corante, que resultam em mudança no seu espectro de absorção.

Existem inúmeras vantagens na utilização da terapia fotodinâmica, primeiramente sabe-se que um dos efeitos colaterais da administração sistêmica de antibióticos é a alteração da microbiota residente em sítios não-alvos. Com a PDT, a resistência microbiana pode ser evitada, uma vez que seu desenvolvimento à ação fotoquímica mediada por radicais livres é improvável (Karrer et al, 1999).

O emprego da PDT pode constituir alternativa viável ao uso de antibióticos para tratamento de infecções localizadas, particularmente as causadas por microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais. A cavidade bucal, por ser um sítio de fácil acesso, torna-se ideal para a realização da terapia fotodinâmica.

7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os parâmetros do laser utilizados neste estudo, pode-se concluir que:

- A concentração mais eficaz para o fotossensibilizador azul de metileno foi de 37,5 μM para os experimentos com células planctônicas. Para os experimentos com biofilmes a concentração mais eficaz variou entre 300 a 1800 μM dependendo do microrganismo testado.
- A concentração mais eficaz para o fotossensibilizador azul de toluidina variou entre 37,5 a 75 μM para os experimentos com células planctônicas e entre 150 a 300 μM para experimentos com biofilme dependente do microrganismo testado.
- Para o fotossensibilizador verde de malaquita os melhores resultados foram obtidos em concentrações maiores (300 a 3000 μM) quando comparado aos corantes azuis.
- Os fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita foram eficazes na redução dos microrganismos testados após a realização da terapia fotodinâmica.
- A maior redução microbiana observada foi alcançada pelo fotossensibilizador verde de malaquita, em relação aos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina.

8 REFERÊNCIAS*

Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Macarini VC. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arq Odontol.* 2006;42(3):199-210.

Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast.* 2008;25(6):385-417.

Bennett JW, Lewis JS, Ellis MW. Dalbavancin in the treatment of complicated skin and soft-tissue infections: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):31-40.

Benvindo RG, Braun G, Carvalho AR, Bertolini GRF. Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro. *Rev Fisioter Univ São Paulo.* 2008;15(1):71-7.

Brovko LY, Meyer A, Tiwana A, Chen W, Filipe CDM, et al. Photodynamic Treatment: A Novel Method for Sanitation of Food Handling and Food Processing Surfaces. *J Food Prot.* 2009;72(5):1020-4.

Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990;48(1):61-9.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Canida*: clearance, colonization or candidiasis? *J Dent Res.* 1995;74(5):1152-61.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Carvalho GG, Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J Microbiol.* 2009;47(5):619-23.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5385-94.

Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol.* 2008;158(3):442-55.

Costa L, Alves E, Carvalho CMB, Tomé JPC, Faustino MAF, Neves MGPMS et al. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect . *Photochem Photobiol Sci.* 2008;7(4):415-22.

Demidova TN, Hamblin MR. Effect of Cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2329-35.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008;8(6):747-63.

Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials.* 2009;30(18):3158-66.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B.* 2007;86(1):59-69.

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

Dunbar LM, Tang DM, Manausa RM. A review of telavancin in the treatment of complicated skin and skin structure infections. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):235-44.

Eick S, Selmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm – an *in vitro* study. *J Clin Periodontol.* 2004;31(5):376-83.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J.* 2005; 38(6):372-80.

Ferro S, Ricchelli F, Monti GM, Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):1026-34.

Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation - will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(12):967-73.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009;44(6):751-9.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *Clin Res.* 2008;34(2):138-42.

Hamblin MR, O’Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, et al. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(1):941-51.

Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br J Anaesth.* 2004;92(1):121-30.

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

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiologia Médica. 21ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2006.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3ªed. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2007.

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

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):877-84.

Karrer S, Szeimies RM, Ernst S, Abels C, Bäuml W, Landthaler M. Photodynamic Inactivation of Staphylococci with 5-Aminolaevulinic Acid or Photofrin. *Lasers Med Sci.* 1999;14:54–61.

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000;72(5):676-80.

Lemos JAC, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic Streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005;7(1): 95-108.

Loberto JCS. *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal e na bolsa periodontal de indivíduos com periodontite crônica: presença e sensibilidade aos antibióticos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2002.

Loberto JCS, Martins CAP, Santos SSF, Cortelli JR, Jorge AOC. *Staphylococcus* spp. in oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. Braz J Microbiol. 2004;35(1):64-8.

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

Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of Novel XF porphyrin derivatives um prokaryotic and eukaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1542-52.

March PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res. 1992;71(7):1431-38.

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

McCarthy GM, Mackie ID, Koval J, Sandhu HS Daley TD. Factors associated with increased frequency of HIV- related oral candidiasis. J Oral Pathol Med. 1991;20(7):332-6.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence and attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg. 1996;25(2):136-44.

Miyabe M. Efeito fotodinâmico antimicrobiano sobre cepas *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes submetidos a antibioticoterapia prolongada [dissertação]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2007.

Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Ponton J. Isolation of *Candida dubliniensis* in teenager with dentadure stomatits. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10(1):25-31.

Nakazato G, Campos TA, Stehling EG, Brocchi M, Silveira WD. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. Pesq Vet Bras. 2009;29(7):479-86.

Naveen R, Mathai E. Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* indifferent patient groups. Indian J Med Res. 2005;122(2):143-7.

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(1):135-42.

Olsen I. Oral adhesion of yeasts. Acta Odontol Scand. 1990;48(1):45-53.

Parsons C, McCoy CP, Gorman SP, Jones DS, Bell SEJ, Brady C, et al. Anti-infective photodynamic biomaterials for the prevention of intraocular lens-associated infectious endophthalmitis. Biomaterials. 2009;30(4):597-602.

Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quim Nova. 2007;30(4):988-94.

Prates RA. Verde de malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bacteriana sobre *A. actinomycescomitans* - um estudo *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo (SP): Universidade de São Paulo- USP; 2005.

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

Querido SMR. Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibióticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar [tese]. São José dos Campos (SP): : Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2006.

Raghavendra M, Koregol A, Bholá S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J.* 2009;54 Suppl1:102-9.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003;11(2):94-100.

Sahu K., Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta PK. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B.* 2009;96(1):9-16.

Salmon-Divon M, Nitzan Y, Malik Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso (N- methylpyridyl) porphine. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):423-29.

Santos SSF, Jorge AOC. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. *Rev Odontol UNESP.* 1998;27(2):473-84.

Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on Staphylococcal Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(1):299-305.

Sedgley CM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese. *Arch Oral Biol.* 1994;39(6):459-66.

Siegel RE. Emerging Gram-Negative Antibiotic Resistance: Daunting Challenge Declining Sensitivities, and Dire Consequences. *Respir Care.* 2008;53(4):471-9.

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

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiology*. 2001;50(11):940-6.

Spesia, MB, Lazzeri D, Pascual L, Rovera M, Durantini EN. Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(3):289-95.

Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):3-10.

Souza SC, Junqueira CJ, Balducci I, Koga-Ito CY, Murin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida species* by low lasers light. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83(1):34-8.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(3):385-9.

Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):196-203.

Teichet MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(2):155-60.

Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(3):10-5.

Thomas KA. Impact of Empiric Antimicrobial Therapy on Outcomes in Patients with *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: A Cohort Study. *BMC Infect Dis.* 2008;8(116): 2-9.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 8ªed. São Paulo: Editora Artmed; 2005.

Tubby S, Wilson M, Nair SP. Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent *BMC Microbiology*. 2009;9(211):1471-2180.

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

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003;71(1-3):87–98.

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

Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2004; 53(2):119-126.

Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2008;85(1):11–9.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(8):354-7.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):412-8.

Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera AJ, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. J Antimicrob Chemother. 2005;56(2):324-30.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. Eur J Oral Sci. 2006;114(1):64-9.

Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, Wilson M. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent BMC Microbiol [serial on the Internet]. 2009 Feb [cited 2009 Feb 4]; [about 8p.]. Available from: doi: 10.1186/1471-2180-9-27.

APÊNDICE A – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador azul de metileno para células planctônicas

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,48	7,48	0,00
3000 μM	6,61	6,55	0,30
1800 μM	6,66	6,65	0,19
600 μM	6,54	6,75	0,49
300 μM	6,30	6,25	0,78
150 μM	6,32	6,46	0,70
75 μM	6,11	6,17	0,92
37,5 μM	6,11	6,06	0,85

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,48	7,48	0,00
3000 μM	7,43	7,48	0,10
1800 μM	7,23	7,21	0,16
600 μM	7,10	7,06	0,18
300 μM	7,03	7,08	0,26
150 μM	7,02	7,01	0,26
75 μM	6,92	6,82	0,53
37,5 μM	6,91	7,09	0,51

Tabela 3 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,01	6,02	0,13
3000 μM	5,61	5,55	0,22
1800 μM	5,50	5,44	0,34
600 μM	5,41	5,33	0,36
300 μM	5,43	5,37	0,46
150 μM	5,39	5,31	0,28
75 μM	5,42	5,34	0,26
37,5 μM	5,38	5,35	0,18

APÊNDICE B – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador azul de metileno para o grupo de biofilme

Tabela 4 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,31	5,48	0,41
3000 μM	4,69	4,99	0,98
1800 μM	4,45	4,39	0,58
600 μM	4,51	4,39	0,69
300 μM	4,28	4,37	0,76
150 μM	4,56	4,47	0,62
75 μM	4,76	4,64	0,47
37,5 μM	4,88	4,81	0,38

Tabela 5 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,88	5,78	0,50
3000 μM	5,25	5,17	0,73
1800 μM	4,96	4,78	0,79
600 μM	5,13	4,97	0,60
300 μM	5,05	5,02	0,44
150 μM	5,11	5,10	0,45
75 μM	5,18	5,01	0,47
37,5 μM	4,97	4,96	0,30

Tabela 6 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de metileno para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,39	6,41	0,11
3000 μM	6,21	6,21	0,17
1800 μM	6,07	6,06	0,34
600 μM	5,93	5,98	0,51
300 μM	5,97	5,90	0,44
150 μM	6,16	6,21	0,21
75 μM	6,11	6,08	0,29
37,5 μM	6,10	6,10	0,25

APÊNDICE C – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador azul de toluidina para células planctônicas

Tabela 7 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,48	7,48	0,00
3000 μM	7,29	7,37	0,26
1800 μM	6,52	6,78	0,63
600 μM	6,19	6,10	0,50
300 μM	6,25	6,43	0,62
150 μM	6,10	6,10	0,31
75 μM	5,73	5,82	0,50
37,5 μM	6,00	6,16	0,52

Tabela 8 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,48	7,48	0,00
3000 μM	7,48	7,48	0,00
1800 μM	7,40	7,48	0,16
600 μM	7,18	7,19	0,22
300 μM	6,83	7,12	0,70
150 μM	6,90	7,02	0,57
75 μM	6,83	6,95	0,39
37,5 μM	6,71	6,79	0,33

Tabela 9 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,92	5,90	0,08
3000 μM	5,40	5,47	0,22
1800 μM	5,42	5,43	0,14
600 μM	5,45	5,42	0,19
300 μM	5,11	5,11	0,31
150 μM	5,05	4,98	0,39
75 μM	5,03	5,02	0,42
37,5 μM	5,11	5,10	0,18

APÊNDICE D – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador azul de toluidina para o grupo de biofilme

Tabela 10 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,31	5,48	0,41
3000 μM	5,03	5,02	0,42
1800 μM	4,68	4,67	0,53
600 μM	4,61	4,57	0,37
300 μM	4,36	4,27	0,62
150 μM	4,27	4,19	0,68
75 μM	4,51	4,63	0,72
37,5 μM	4,46	4,41	0,62

Tabela 11 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,03	6,19	0,51
3000 μM	5,81	5,99	0,63
1800 μM	5,56	5,62	0,81
600 μM	5,77	5,78	0,49
300 μM	5,73	5,87	0,79
150 μM	5,30	5,58	1,02
75 μM	5,50	5,42	0,71
37,5 μM	5,46	5,54	0,84

Tabela 12 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com azul de toluidina para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,27	6,41	0,39
3000 μM	5,70	5,90	0,78
1800 μM	5,74	5,90	0,63
600 μM	5,69	5,88	0,76
300 μM	5,47	5,79	0,91
150 μM	5,63	5,78	0,63
75 μM	5,75	5,88	0,56
37,5 μM	5,68	5,74	0,55

APÊNDICE E – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador verde de malaquita para células planctônicas

Tabela 13 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,45	7,48	0,07
3000 μM	5,76	5,70	0,35
1800 μM	7,12	7,14	0,25
600 μM	7,34	7,32	0,09
300 μM	7,25	7,23	0,11
150 μM	7,32	7,28	0,10
75 μM	7,41	7,46	0,10
37,5 μM	7,44	7,48	0,12

Tabela 14 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	7,48	7,48	0,00
3000 μM	0,95	0,00	2,33
1800 μM	7,16	7,23	0,27
600 μM	7,36	7,45	0,17
300 μM	7,40	7,48	0,14
150 μM	7,42	7,48	0,10
75 μM	7,49	7,48	0,11
37,5 μM	7,47	7,48	0,02

Tabela 15 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento na forma planctônica

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,01	6,02	0,13
3000 μM	5,66	5,60	0,17
1800 μM	5,66	5,69	0,11
600 μM	5,63	5,58	0,24
300 μM	5,69	5,69	0,19
150 μM	5,67	5,64	0,21
75 μM	5,74	5,70	0,18
37,5 μM	5,74	5,76	0,11

APÊNDICE F – Dados individuais dos ensaios realizados com o fotossensibilizador verde de malaquita para o grupo de biofilme

Tabela 16 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Staphylococcus aureus* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,48	5,48	0,00
3000 μM	3,85	3,78	0,69
1800 μM	5,21	5,38	0,34
600 μM	5,17	5,18	0,25
300 μM	5,30	5,38	0,26
150 μM	5,10	5,14	0,34
75 μM	5,33	5,34	0,17
37,5 μM	5,35	5,48	0,20

Tabela 17 - Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Escherichia coli* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	5,98	6,04	0,43
3000 μM	1,92	1,50	2,30
1800 μM	4,51	4,30	0,95
600 μM	5,37	5,74	1,11
300 μM	5,73	5,50	0,42
150 μM	5,76	5,69	0,54
75 μM	5,36	5,63	1,00
37,5 μM	5,50	5,44	0,78

Tabela 18- Unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de *Candida albicans* após aplicação da Terapia fotodinâmica com verde de malaquita para experimento em biofilme

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
Controle - 0 μM	6,39	6,41	0,11
3000 μM	5,74	5,81	0,51
1800 μM	5,92	6,02	0,40
600 μM	5,90	5,90	0,49
300 μM	5,62	5,47	0,55
150 μM	5,66	5,83	0,53
75 μM	5,94	5,85	0,42
37,5 μM	6,12	6,07	0,29

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas
CEP 13201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janete@fojoc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **065/2008-PH/CEP**, sobre **“Concentração inibitória mínima de diferentes fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana”**, sob a responsabilidade de **SIMONE FURGERI GODINHO VILELA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 14 de outubro de 2008.



Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

ANEXO B – Alteração do título junto ao comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

R. Eng. Francisco José Longo, 777 - São José dos Campos - SP 12231-970 - F. (12) 994-4000 - FAX (12) 994-8493



**Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos**

São José dos Campos, 10 de agosto de 2009

Ofício nº 045/09-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	SIMONE FURGERI GÓDINHO VILELA
Projeto	Concentração inibitória mínima de diferentes fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana
PARECER	
<p>Por solicitação da Orientadora da Pesquisadora, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, passando a denominar-se "AÇÃO DE DIFERENTES FOTOSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 65/2008-PH/CEP de 14/10/2008.</p>	

Atenciosamente,

Prof. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Vilela S.F.G. *Action of different photosensitizers in photodynamic therapy antimicrobial [dissertation]. School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- São Paulo State University; 2010.*

ABSTRACT

The purpose of this study will be evaluate the action of photosensitizers methylene blue, toluidine blue and malachite green for photodynamic antimicrobial therapy on planctonic and biofilm strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. In each group ten strains will be studied (1 ATCC and 5 clinical strain). An acrylic resin applying will be used for biofilm formation that will be immersed in steribe brain-heart infusion (BHI) broth containing 5% sacarose, then inoculated with standardized suspension of microorganisms and incubated at 37° C for four days. The photosensitizer will be prepared in the following concentrations: 3.000, 1.800, 600, 300, 150, 75, 37,5 µM and will be immersed the applying containing biofilm. The light source used will be a diode laser, with output power of 100mW and wavelength of 660nm. The control group will be treated under same condition, without photosesitizer. For the planctonic cells study, after irradiation, serial dilutions will be obtained from each sample in physiological solution and aliquots of 0,1ml will planted on BHI or Saboraud dextrose agar. After incubation at 37°C for 24 or 48 hours the number of colony forming units will be calculated. For the biofim study, after irradiation the acrylic resin applying will be submitted to an ultrasonic homogenization. Serial dilution will be prepared and plated on BHI or Sabouraud dextrose agar. After incubation at 37°C for 24 or 48 hours the number of colony forming units will be calculated. The results will be submitted to statistical analysis. The most effective concentrations of photosensitizers ranged from 37.5 to 1800 µM for methylene blue, 37.5 to 300 µM for toluidine blue and from 300 to 3000 µM for malachite green. Most microbial reduction was observed with the photosensitizer malachite green. It was concluded that the photosensitizers studied were effective in reducing microorganisms after photodynamic therapy.

Keywords: Photodynamic therapy. Photosensitizers. *Staphylococcus aureus. Escherichia coli. Candida albicans.*