

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/03/2022.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Analú Barros de Oliveira**

**Bioprospecção de produtos naturais em terapia fotodinâmica contra micro-organismos de interesse médico-odontológico**

**Araraquara**

**2020**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Analú Barros de Oliveira**

**Bioprospecção de produtos naturais em terapia fotodinâmica contra micro-organismos de interesse médico-odontológico**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Lourenção Brighenti**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Raquel Fontana**

**Araraquara**

**2020**

Oliveira, Analú Barros de  
Bioprospecção de produtos naturais em terapia  
fotodinâmica contra micro-organismos de interesse médico-  
odontológico / Analú Barros de Oliveira. -- Araraquara: [s.n.],  
2020  
77 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –  
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti  
Coorientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana  
Mendonça

1. Fotoquimioterapia 2. Plantas medicinais 3. Infecções  
bacterianas e micoses 4. Produtos com ação antimicrobiana  
I. Título

## **DADOS CURRICULARES**

### **Analú Barros de Oliveira**

**NASCIMENTO:** 20/04/1990 Cascavel/PR - Brasil

**FILIAÇÃO:** João Barros de Oliveira  
Marli de Fátima Stievano de Oliveira

**2012/2018:** Curso de graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

**2018/2020:** Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas  
Área de concentração: Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

À Deus...

Ofereço esta conquista à Deus, que com sua infinita bondade e sabedoria foi um verdadeiro guia nesta longa jornada.

Obrigada meu Deus por ter colocado em minha vida uma família tão amorosa e compreensiva, amigos acolhedores e professores excepcionais. Com eles pude vivenciar momentos maravilhosos de aprendizado e crescimento pessoal.

Obrigada Senhor pelas inúmeras graças concedidas e pelas batalhas vencidas.

*“Tudo posso naquele que me fortalece”  
(Filipenses 4:13)*

## Aos Meus Pais...

À minha mãe Marli e meu pai João, que são exemplos de trabalho, respeito e amor, dedico este trabalho com todo amor e gratidão, por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto a minha formação.

Vocês são minha alegria e razão de viver.

Reconheço que também se sacrificaram para esta conquista, mudaram suas rotinas e sofreram com a minha ausência.

Dedico e divido com vocês, meus pais queridos, o mérito deste trabalho e o meu amor eterno e infinito!

## Aos Meus Irmãos...

Aos meus irmãos Marcos e Paulo, sou grata pelo amor e carinho incondicional que depositaram em mim. Mesmo distante, de alguma forma fizeram parte desta conquista.

## *Ao Meu Namorado...*

Dedico especialmente este trabalho ao meu amor, Túlio.

Você viveu comigo todas as emoções deste curso de mestrado que hoje termino. Sou grata pelo seu companheirismo, carinho e imenso amor. Seu incentivo, atenção e proteção tornam essa caminhada mais segura e tranquila. Obrigada por sempre me ajudar em tudo o que eu precisei.

Você foi a minha força nas vezes que fraquejei. Você acreditou em mim até mesmo quando eu já não acreditava. Sou feliz por ter você em minha vida.

Te amo sempre.

## Aos Meus Familiares...

Dedico este trabalho em especial à minha amada e sempre doce tia Terezinha de Jesus do Prado (*in memoriam*) agradeço as palavras de carinho, apoio e estímulo para enfrentar as barreiras da vida; ao meu amado e saudoso tio José Carlos Stievano (*in memoriam*) que sempre confiou e acreditou no meu potencial. Sei que de onde vocês estiverem estão vibrando com mais esta conquista. Obrigada por caminharem ao meu lado.

Dedico também este trabalho, aos meus sogros, João e Rosana por todo o carinho e amor com qual me acolheram em sua família; ao meu cunhado Iago pela amizade e companheirismo.

A toda família Ferrisse e Morandin meu amor e gratidão

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Profª Drª Fernanda Lourenção Brighenti**, agradeço por todo carinho e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho; por toda dedicação, paciência e por ser uma excelente professora e profissional, a qual me espelho. Sua responsabilidade e cuidado comigo foram fundamentais para que eu conseguisse concluir esse trabalho Obrigada pela sensibilidade em apontar meus erros e novos desafios, me ajudando a vencê-los.

Minha sincera gratidão e admiração por você.

Á minha coorientadora, **Profª Drª Carla Raquel Fontana Mendonça**, agradeço pela confiança depositada em mim e por ter compartilhado comigo algo que não tem preço: Conhecimento. Sou grata por todas as suas orientações e conselhos que vão além do âmbito científico, sempre com uma postura humilde e acolhedora. Admiro-lhe pela forma tranquila e competente com que conduz tudo que faz, sempre com um grande sorriso no rosto. Exemplo de mulher forte e inteligente. Conviver com você foi um presente, muito obrigada pela oportunidade e por ter contribuído para este momento se tornar realidade!

Ao **Prof Dr Alberto José Cavalheiro**, muito obrigada pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos transmitidos. Além de todo reconhecimento pela sua ajuda, disponibilidade e companheirismo. Sua extrema competência contribuiu para a concretização dessa dissertação.

À **Profª Drª Maria Goretti Vasconcelos Silva** e à aluna **Maria Gleiziane Araújo Franca**, que de maneira discreta, porém decisiva, estiveram presentes em todos os momentos críticos dessa minha caminhada, cedendo os materiais vegetais testados no presente trabalho.

*“Ensinar não é transferir conhecimento,  
mas criar possibilidades para a sua produção ou a sua construção.  
Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.”*

**(Paulo Freire)**

À minha amiga **Sarah**, serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Conviver com você é um eterno aprendizado e agradeço por tudo o que me ensinou. E olha que foi quase tudo! Você é uma pessoa com coração imenso, que sente prazer em ajudar e se alegra com as conquistas alheias como se fossem suas! Obrigada pela preocupação e carinho com que sempre me tratou. Obrigada pela ajuda em tempo integral, por me ouvir sempre que precisei e pelos milhares de conselhos. Minha “anja da guarda”, te levarei no coração por toda vida.

À minha melhor amiga **Camilla**, menina de ouro! Querida, doce e carinhosa, com quem sempre contei durante todos os anos da graduação e pós-graduação, minha irmã de alma. Sempre disposta e prestativa, com uma maturidade impressionante e um bom humor inabalável, me ensinou muito sobre o que é uma amizade sincera e verdadeira. Você merece toda a felicidade do mundo! Te amo!

À amiga **Karina**, uma menina muito especial. Sempre muito gentil e sorridente, com uma energia que contagia a todos ao seu redor. É sempre bom estar ao seu lado. Com carinho te desejo um futuro próspero e brilhante. Obrigada pelo companheirismo e por sua amizade sincera e verdadeira.

Às amigas **Raquel** e **Lorena**, que vieram de longe e embarcaram junto comigo nesta aventura chamada pós-graduação, muito obrigada pela convivência, carinho, respeito e por todo companheirismo, além das boas risadas, grandes dicas e as idas à padaria fazer lanchinhos. Com vocês este caminho se tornou mais leve. Torço muito por vocês!

Agradeço aos meus bichinhos de estimação que alegram a minha casa, a minha vida e de toda a minha família.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, nas pessoas da Diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de graduação, pós-graduação e crescimento profissional.

À atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa da **Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti**, por sua dedicação e comprometimento com o curso.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia e de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, principalmente **Dulce, Flávia, Neide e Elaine**, obrigada pela ajuda e amizade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, **Cristiano e Alexandre**, pelo excelente trabalho, pela atenção e eficiência em atender.

Aos professores da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/18440-0) pela concessão de bolsa essencial para realização dessa pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram durante o decorrer do curso e colaboraram no desenvolvimento da pessoa que hoje sou, meu muito obrigado.

## ***Prece árabe***

Deus, não consintas que eu seja o carrasco que sangra as ovelhas, nem uma ovelha nas mãos dos algozes.

Ajuda-me a dizer sempre a verdade na presença dos fortes, e jamais dizer mentiras para ganhar os aplausos dos fracos.

Meu Deus, se me deres a fortuna, não me tires a felicidade; se me deres força, não me tires a sensatez; se me for dado prosperar, não permita que eu perca a modéstia, conservando apenas o orgulho da dignidade.

Ajuda-me a apreciar o outro lado das coisas, para não acusar meus adversários com mais severidade do que a mim mesmo.

Não me deixes ser atingido pela ilusão da glória, quando bem-sucedido, e nem pelo desespero, quando derrotado. Lembra-me que a experiência de uma queda poderá proporcionar uma visão diferente do mundo.

Ó Deus! Faze-me sentir que o perdão demonstra força, e que a vingança é prova de fraqueza.

Se me tirares a fortuna, deixe-me a esperança. Se me faltar à saúde, conforta-me com a graça da fé. E quando me ferir a ingratidão e a incompreensão dos meus semelhantes, cria em minha alma a força da desculpa e do perdão.

Finalmente Senhor, se eu Te esquecer, Te rogo que nunca Te esqueças de mim.

\* Autor desconhecido

Oliveira AB. Bioprospecção de produtos naturais em terapia fotodinâmica contra micro-organismos de interesse médico-odontológico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

Este trabalho está dividido em 2 publicações cujos objetivos foram: a) realizar uma revisão sistemática da literatura, seguida de uma metanálise sobre a eficácia da terapia fotodinâmica (TFD) nos micro-organismos responsáveis pela cárie dentária (Publicação 1); b) avaliar o potencial *in vitro* dos óleos essenciais de *Coffea arabica*, *Matricaria recutita* e *Eugenia uniflora* e dos extratos vegetais de *Senna splendida*, *Senna reticulata* e *Senna Macranthera* para serem utilizados como monoterapia na terapia fotodinâmica sobre suspensões de micro-organismos de interesse médico-odontológico. Publicação 1: A questão de pesquisa e as palavras-chave foram construídas de acordo com a estratégia do PICO. A pesquisa do artigo foi realizada nas bases de dados Embase, Lilacs, Scielo, Medline, Scopus, Cochrane Library, Web of Science, Science Direct e Pubmed. Ensaios clínicos randomizados e estudos *in vitro* foram selecionados na revisão. O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes do PRISMA para revisão sistemática. Publicação 2: Foram utilizadas as seguintes cepas de referência em suspensão: *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *Streptococcus mutans* ATCC 35688, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90028. Os materiais vegetais foram testados nas concentrações de 50 µg/mL (extratos) ou 2% (óleos essenciais). Foram estudados cinco grupos: controle negativo, material vegetal sem exposição a luz (FS-luz), material vegetal com exposição a luz (FS+luz), controle de veículo sem exposição a luz (CV-luz) e controle de veículo com exposição a luz (VC+luz). A eficácia da terapia foi avaliada através da contagem de células viáveis após o tratamento. A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada nos materiais vegetais que apresentaram melhor atividade antimicrobiana. Para este teste foram utilizadas as sondas fluorescentes 3'-p- (aminofenil) fluoresceína (APF; detecta principalmente o radical hidroxil [ $\bullet$  OH]) e o Sensor de Oxigênio Singlete (SOSG; detecta oxigênio singlete [ $O_2$ ]). Os dados foram analisados no programa IBM SPSS versão 20.0, com nível de significância de 5%. Para *C. acnes* e *S. mutans* foram observadas reduções microbianas totais em dois dos seis compostos vegetais testados. Já para *S. aureus* e *C. albicans* obtivemos redução microbiana total em 4 dos 6 compostos testados. Por último, foi observado redução total em apenas 1 dos 6 compostos naturais testados para *E. coli*. Os materiais vegetais de *S. macranthera* e *S. reticulata* foram os que mais produziram espécies reativas de oxigênio, seguido de *S. splendida*, *E. uniflora* e *M. recutita*. Os resultados da publicação 1 destacam que não há consenso sobre os protocolos de estudo para TFD contra micro-organismos cariogênicos, embora os resultados tenham mostrado que a TFD pode ser uma boa alternativa para o tratamento de cárie dentária. Já os resultados da publicação 2 mostraram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) mediada por diferentes substâncias naturais foi eficiente na redução microbiana de suspensões de micro-organismos de interesse médico-odontológico.

**Palavras chave:** Fotoquimioterapia. Plantas medicinais. Infecções bacterianas e micoses. Produtos com ação antimicrobiana.

Oliveira AB. Bioprospecting of natural products in photodynamic therapy against microorganisms of medical and dental interest [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## ABSTRACT

This study is divided into 2 publications whose objectives were: a) to carry out a meta-analysis about antimicrobial photodynamic therapy (PDT) in Dentistry (Publication 1) and b) To evaluate the in vitro potential of essential oils of *Coffea arabica*, *Matricaria Recutita* and *Eugenia uniflora* and plant extracts of *Senna Splendida*, *Senna Reticulata* and *Senna Macranthera* for use as monotherapy in photodynamic therapy on suspensions of microorganisms of medical and dental interest. Publication 1: A research question and how keywords were constructed according to the PICO strategy. A search of the article was carried out in the Embase, Lilacs, Scielo, Medline, Scopus, Cochrane Library, Web of Science, Science Direct and Pubmed databases. Randomized controlled trials and in vitro studies were selected in the review. The study was conducted according to the PRISMA guidelines for systematic review. Publication 2: The following references strains were used in suspension: *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *Streptococcus mutans* ATCC 35688, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 90028. The plant materials were tested at 50 µg / mL (extracts) or 2% (essential oils). Five groups were studied: negative control, plant material without exposure to light (FS-light), plant material with exposure to light (FS + light), vehicle control without exposure to light (CV-light) and vehicle control with exposure the light (VC + light). The effectiveness of the therapy was assessed by counting viable cells after treatment. The production of reactive oxygen species was evaluated in plant materials that showed the best antimicrobial activity. For this test, 3'-p- (aminophenyl) fluorescent probes (APF; mainly detects the radical hydroxyl [ $\bullet$ OH]) and the Singlet Oxygen Sensor (SOSG; detects singlet oxygen [ $O_2$ ]) were used. The data were analyzed using the IBM SPSS version 20.0 program, with a significance level of 5%. For *C. acnes* and *S. mutans*, total microbial reduction was observed in 2 of the 6 plant materials tested. For *S. aureus* and *C. albicans*, total microbial reduction was observed in 4 of the 6 plant materials tested. A total reduction of 1 out of 6 natural materials was observed for *E. coli*. *S. macranthera* and *S. reticulata* were produced the greatest amount of reactive oxygen species, followed by *S. splendida*, *E. uniflora* and *M. recutita*. In conclusion, Publication 1 highlights that there is no consensus on the study protocols for PDT against cariogenic microorganisms, although the results shown that a PDT may be a good alternative for the treatment of dental caries. Publication 2 shows that antimicrobial photodynamic therapy (PDT) mediated by different natural substances was efficient in reducing microbial suspensions of microorganisms of medical and dental interest.

**Keywords:** Photochemotherapy. Medicinal plants. Bacterial infections and mycoses. Products with antimicrobial action.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>3 PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>43</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são componentes importantes da biosfera e desempenham um papel vital na manutenção dos ecossistemas<sup>1</sup>. Para sobreviver, os micro-organismos desenvolveram mecanismos que lhes permitiram responder à pressão seletiva exercida por diversos fatores<sup>2</sup>.

Os seres humanos expuseram continuamente populações microbianas patogênicas a antibióticos, anti-sépticos e outros agentes antimicrobianos, na tentativa de controlar doenças infecciosas. No entanto, esses micro-organismos responderam desenvolvendo uma variedade de mecanismos de resistência tornando os atuais tratamentos antimicrobianos pouco eficazes<sup>3</sup>. A utilização de tratamentos não convencionais para o combate de micro-organismos de interesse médico-odontológico, que possibilitem menor chance de causar resistência é de grande relevância, e é neste ponto que as técnicas de terapia fotodinâmica (TFD) destacam-se, uma vez que tem se mostrado uma ferramenta eficaz no tratamento de diversas enfermidades<sup>4</sup>.

O princípio da terapia fotodinâmica foi descrito pela primeira vez em 1990 por Oscar Raab e seu professor, Herman Von Tappeiner, que investigando a ação de um corante (acridina) em culturas de paramécios comprovaram que a associação deste corante com a luz era letal para estes microrganismos<sup>5</sup>. Posteriormente, outros estudos realizados pelo professor Herman Von Tappeiner permitiram criar o termo “ação fotodinâmica” para descrever uma reação dependente de oxigênio após fotossensibilização, pois observaram que a luz e o corante isoladamente não apresentavam qualquer efeito citotóxico sobre as culturas dos protozoários<sup>6</sup>.

No mesmo ano, o cientista dinamarquês Niels Finsen, publicou o livro “Phototerapy”, que demonstrava relatos de sucesso do uso da aplicação de fontes de luz no tratamento de pacientes portadores de lúpus cutâneo, sendo premiado em 1903 com o Prêmio Nobel na área da Medicina<sup>7</sup>.

Em 1907, von Tappeiner e colaboradores, publicaram um livro-texto sobre TFD, definindo-a como um processo de fotossensibilização dependente de oxigênio, criando assim o termo “ação fotodinâmica”. Neste livro, os autores relataram suas experiências com eosina tópica a 5% e luz artificial para tratamento de câncer cutâneo não melanoma e de outras dermatites, como lúpus e condiloma. Com estudos adicionais, von Tappeiner presumiu que a eosina, assim como a acridina,

após incorporação a célula alvo, poderia produzir uma reação citotóxica quando exposta a uma fonte de luz adequada na presença de oxigênio<sup>8</sup>.

Porém, devido a sua toxicidade e potencial carcinogênico, os corantes acridina e eosina foram logo descartados. Então, em 1908, surgiram os primeiros casos envolvendo o uso de porfirinas como agente fotossensível, o que causou um grande alvoroço na comunidade científica. Alguns anos após esta descoberta, Albert Policard detectou a emissão de fluorescência de tumores expostos a porfirinas quando eram irradiados, presumindo-se que as porfirinas se concentravam preferencialmente em neoplasias. A partir de então, diversas pesquisas foram desenvolvidas para estudar este mecanismo<sup>9</sup>.

Em paralelo às diversas pesquisas que estudavam a aplicabilidade da TFD, Albert Einstein, em 1916, criava a teoria “os princípios da luz pela emissão estimulada da radiação”, que, posteriormente, resultaria no desenvolvimento do primeiro dispositivo de laser por Theodore Maiman, proporcionando assim uma série de pesquisas envolvendo a interação de luz e tecido<sup>10</sup>.

Em 1925, Policard avaliou a capacidade de porfirinas produzirem efeito fototóxico. Posteriormente Auler e Banzer confirmaram as observações de Policard, sugerindo a aplicação de porfirinas para o diagnóstico e detecção inicial de tumores malignos<sup>11</sup>.

Em 1976, Weishaupt e colaboradores propuseram que o oxigênio singleto, originado da sensibilização a luz, a partir da transferência da energia do agente fotossensível no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular em estado fundamental, era o agente responsável pela citotoxicidade e desativação das células alvo<sup>11</sup>.

Em 1998, a FDA (*Food and Drug Administration/ EUA*) aprovou o uso da TFD para tratamento de câncer, seguido de vários países como Holanda, Japão, Alemanha entre outros<sup>12</sup>.

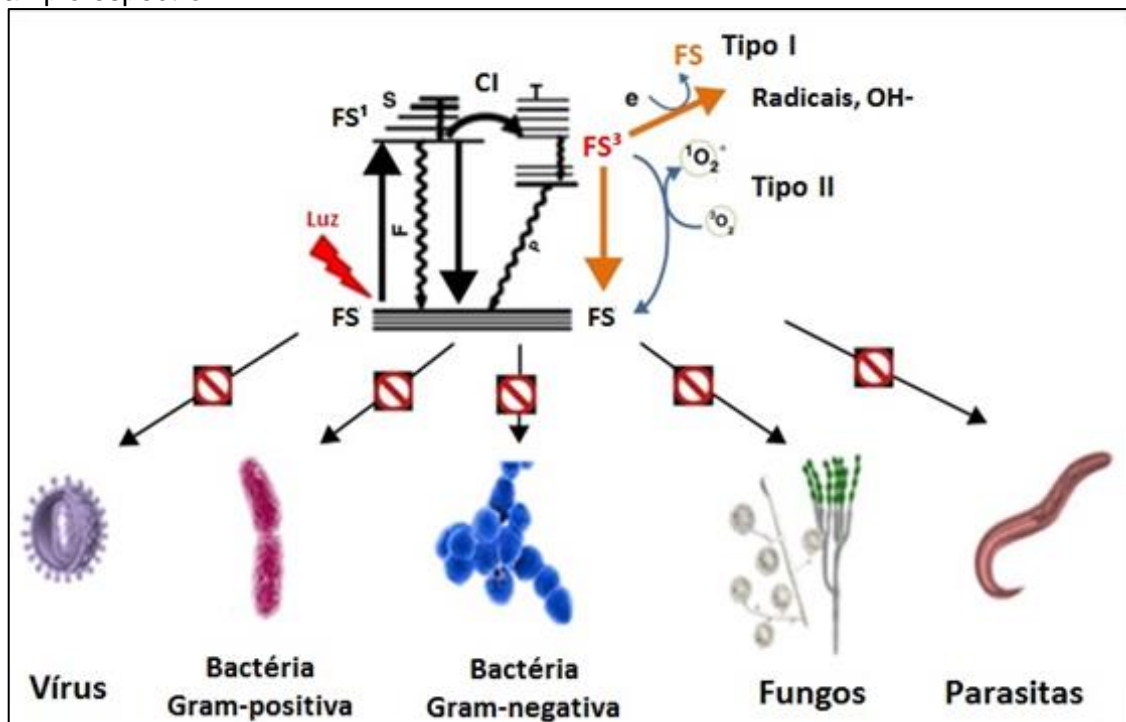
A implantação da TFD no Brasil envolveu uma equipe composta, principalmente, por físicos do Instituto de Física de São Carlos (USP) e médicos do Hospital Amaral Carvalho de Jaú - São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (Projeto FAPESP nº 98/14270-8). Porém, apenas em 2006 a TFD foi aprovada para tratamento de câncer de pele não melanoma no Brasil. Nos últimos 10 anos, seu uso ampliou para diversas outras indicações<sup>13</sup>.

Resumidamente, a TFD é uma modalidade de tratamento que associa mecanismos foto-físicos e fotoquímicos gerando resposta biológica através do uso de fontes de luz específicas e de um agente fotossensibilizador associado ao oxigênio<sup>8</sup>. Para o sucesso dessa terapia, é necessário que o agente fotossensibilizador (FS) esteja disponível em sua forma pura e que sua composição química seja conhecida, que seja sintetizável a partir de precursores disponíveis e facilmente reproduzidos, que possua alto rendimento quântico de oxigênio singleto, que seja estável cinética e termodinamicamente, seja seletivo para induzir a morte apenas das células alvo, possuir atividade biológica apenas quando exposto à fonte de luz, estável e solúvel nos fluidos dos tecidos do corpo e de fácil entrega aos tecidos alvos através de injeção ou de outros métodos e que seja excretado facilmente após a conclusão do tratamento<sup>14</sup>.

Os processos fotoquímicos da TFD iniciam após a absorção de fótons pelo agente fotossensibilizador, ocasionando a transição do estado fundamental para o excitado. Em seu estado fundamental (S<sub>0</sub>) a molécula do agente fotossensibilizador apresenta-se como singleto, que passa para seu estado singleto excitado de vida curta (S<sub>1</sub>) em decorrência da absorção de luz. Neste momento, esta molécula em S<sub>1</sub> pode voltar ao estado fundamental, emitindo fluorescência, ou sofrer uma transição para o estado tripleto de vida mais longa através do cruzamento inter-sistemas<sup>15</sup>.

No estado tripleto excitado, o agente fotossensibilizador é passível de reagir com moléculas biológicas através de dois principais mecanismos que são dependentes de oxigênio, denominados de reação tipo I e reação tipo II<sup>11,16</sup>. Na reação tipo I, o agente fotossensibilizador reage com biomoléculas como, por exemplo, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, transferindo elétrons para dar origem a radicais e íons radicais. A reação com o oxigênio molecular resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como por exemplo, o ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Já na reação tipo II, o agente fotossensibilizador transfere energia diretamente ao oxigênio em seu estado tripleto fundamental, em um fenômeno chamado aniquilação tripleto-tripletto. Há a formação de oxigênio singleto, que é altamente reativo e citotóxico, e que pode reagir com um grande número de substratos biológicos e induzir dano oxidativo na membrana celular e na parede celular<sup>11,16</sup>. O oxigênio singleto tem uma vida curta em sistemas biológicos e causa uma resposta localizada sem afetar células ou órgãos distantes<sup>17</sup>. A Figura 1 ilustra os tipos de reações acima citados e suas ações em TFDa.

**Figura 1** - Diagrama de Jablonski ilustrando a produção fotoquímica de diferentes espécies reativas de oxigênio durante a TFD e suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro

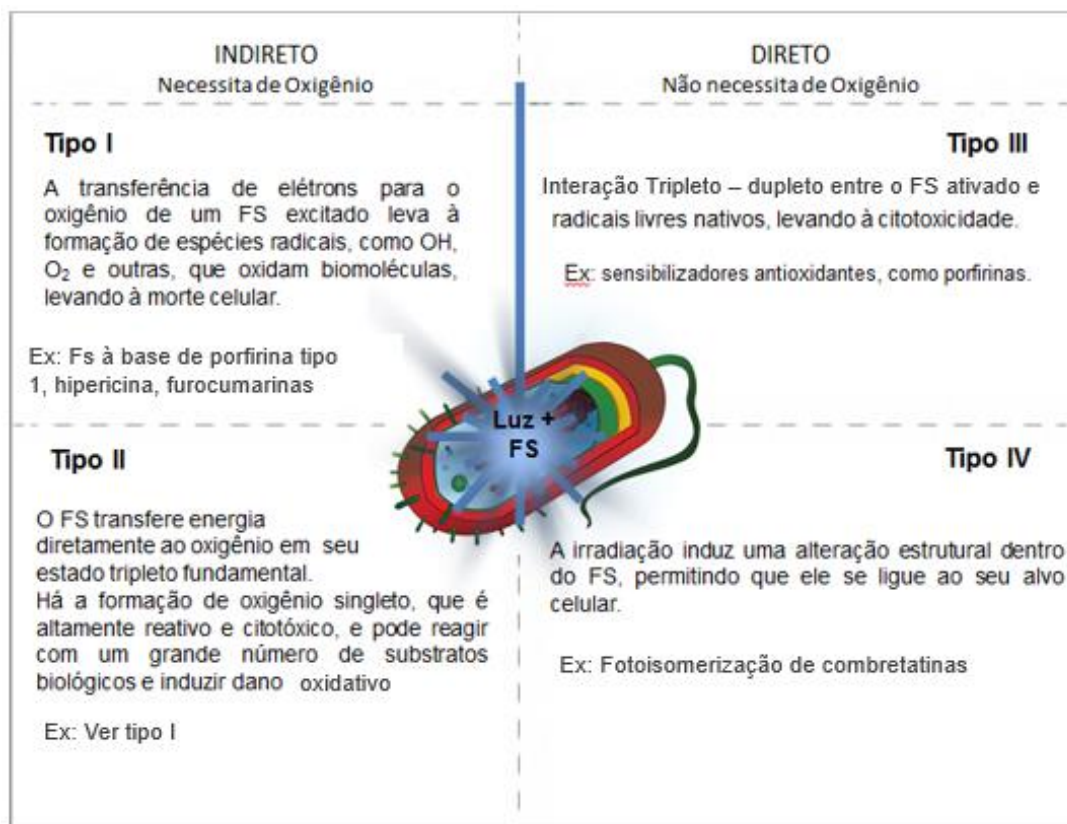


O estado fundamental FS absorve um fóton para formar o estado excitado singlete  $FS^1$  que pode passar pelo cruzamento inter-sistema (CI) para formar o estado tripleto  $FS^3$ . Esta espécie de vida longa pode sofrer transferência de energia (Tipo II) para formar oxigênio singlete  $O_2^*$  ou transferência eletrônica (Tipo I) para formar radicais hidroxilas ( $OH^-$ ). Ambas são capazes de matar um amplo espectro de patógenos.

Fonte: Adaptado de Hamblin et al.<sup>29</sup>.

Além dos mecanismos indiretos (que requerem oxigênio), existem os mecanismos diretos (independentes de oxigênio) de fotossensibilização na TFD. Esses mecanismos vêm sendo discutidos na literatura científica, de acordo com do FS utilizado (Figura 2). Tratam-se das reações de tipo III e reações de tipo IV, que confiam na ativação de fotossensibilizadores para induzir a morte celular sem a dependência do oxigênio para transferência de energia ou carga<sup>15</sup>.

**Figura 2.** Mecanismos diretos (independentes de oxigênio) e indiretos (que requerem oxigênio) de fotossensibilização na TFD, dependendo do FS utilizado.



Fonte: Adaptado de Scherer et al.<sup>15</sup> 2017.

A maioria dos fotossensibilizadores utilizados na clínica demonstra a presença do mecanismo Tipo II, mas fotossensibilizadores que utilizam o mecanismo Tipo III e IV também são eficazes, especialmente nas situações em que a fotossensibilização dos Tipos I e II é limitada. Geralmente, os fotossensibilizadores do tipo III transportadores antioxidantes que diminuem a concentração do radical nas células-alvo e geram oxigênio singleto. Na reação do tipo IV, os fotossensibilizadores não podem se ligar ao alvo molecular e, após irradiação, pode ocorrer um processo chamado fotoisomerização. Esse processo causa remodelação intramolecular, que facilita a ligação do fotossensibilizador ao alvo celular. Contudo, mais estudos devem ser realizados para melhor entendimento dessas reações<sup>15</sup>.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), é indicada em várias modalidades da Medicina e da Odontologia, uma vez que a maioria das enfermidades infecciosas são localizadas e possibilitam o acesso e a ação direta dos

agentes fotossensibilizadores<sup>18</sup>. A formação de oxigênio singlete é a principal via de dano celular microbiano<sup>17</sup>.

Doenças de origem microbiana são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo, tais doenças ocupam um lugar de destaque no panorama mundial de saúde, uma vez que em consequência dessas doenças, podem ocorrer não só injúrias na pele, mucosa bucal e vaginal, pulmões, mas também, septicemias e endocardites<sup>19</sup>. Dentre os principais agentes etiológicos de doenças de interesse, destacam-se *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cutibacterium acnes*, cuja importância médico-odontológica está descrita no (Quadro 1).

**Quadro 1** - Características morfológicas e importância médico-odontológica das espécies de micro-organismo em estudo

<b>Espécie</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Importância médico-odontológica</b>
<i>C. acnes</i>	Gram-positivo	Principal agente etiológico da acne vulgar presentes em lesões endodônticas secundárias, nos casos de periodontite agressiva e está associada ao aparecimento de pneumonia em pacientes sob ventilação mecânica <sup>19,20,21</sup> .
<i>C. albicans</i>	Células esféricas, Gram-positivo	Infecções Orais e Vaginais <sup>22</sup> .
<i>E. coli</i>	Bastonete Gram-negativo	<i>Relacionada a diversas doenças intestinais e infecções em feridas. Também encontrado em infecções endodônticas</i> <sup>23,24</sup> .
<i>S. aureus</i>	Coco Gram-positivo	<i>Principal agente causador de infecções hospitalares em todo o mundo, na cavidade oral está relacionada com a ocorrência de doença periodontal, mucosite peri-implantar e peri-implantite</i> <sup>25,26</sup> .
<i>S. mutans</i>	Coco Gram-positivo	Frequentemente isolado de lesões de cárie dentária <sup>27</sup> .

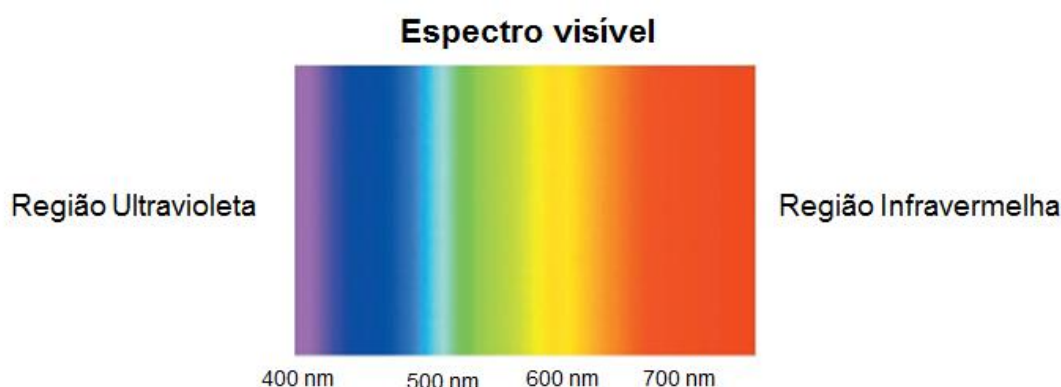
Fonte: Elaboração própria.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana já vem sendo utilizada com sucesso em casos de micro-organismos resistentes a antibióticos ou em associação com os medicamentos existentes para aumentar sua eficácia<sup>28,29</sup>. Neste contexto, uma das vantagens da TFDa em relação à antibioticoterapia, é que até o momento não há relatos de desenvolvimento de resistência microbiana a essa modalidade de tratamento, uma vez que o seu mecanismo de ação é baseado através da produção de oxigênio singleto, causando a eliminação destes micro-organismos em um curto espaço de tempo<sup>4,18</sup>.

A natureza dos agentes fotossensibilizadores utilizados em TFDa é muito vasta, podendo existir compostos de origem sintética ou natural<sup>30-35</sup>. Apesar da maior estabilidade presente pelos compostos sintéticos, compostos naturais têm sido amplamente estudados e aceitos, principalmente porque eles são menos propensos a efeitos colaterais e interações medicamentosas<sup>31,33,36-39</sup>.

Para que um composto seja considerado um fotossensibilizador, além da absorção dentro do espectro de luz visível incidente, é necessário que ele apresente outras características (Figura 3). Idealmente, o fotossensibilizador deve apresentar baixa toxicidade no escuro, causando dano celular apenas quando irradiado, permanecer no estado excitado tempo suficiente para sua interação e seletividade com as células alvo, alto rendimento quântico, baixo tempo de meia vida para rápida eliminação dos tecidos, composição química bem definida, não causar mutagenicidade ou carcinogenicidade e ser cineticamente e termodinamicamente estável para conferir um tempo de prateleira adequado<sup>40</sup>.

**Figura 3** - Visualização do espectro de luz visível



Fonte: Adaptado de Soukos e Godson<sup>41</sup> (2011).

Entretanto, ainda não há disponível um FS que reúna todas as características ideais. Portanto, nos últimos anos, houve um aumento no interesse de compostos naturais para aplicação como fotossensibilizadores em TFD<sup>42</sup>. Marrelli<sup>43</sup> e colaboradores realizaram uma revisão da literatura observando diferentes compostos à base de plantas utilizados em TFD para tratamento de câncer de pele com resultados promissores.

Um fator que contribui para utilização de compostos naturais em TFD é a facilidade com que essas substâncias conseguem aderir ou atravessar a membrana citoplasmática e o seu potencial em produzir espécies reativas de oxigênio<sup>44</sup>. Outra vantagem de se utilizar compostos naturais, é que, embora o isolamento desses compostos não seja fácil, a quantidade de matéria prima disponível para ser estudada é enorme, em especial no Brasil, onde há uma rica flora avaliada como fonte incalculável de riquezas naturais e que atrai pesquisadores de todo o mundo<sup>45</sup>.

Desse modo, o estudo de materiais vegetais pode ser uma fonte interessante para a descoberta de agentes fotossensibilizantes para serem utilizados em TFD. Portanto, esse trabalho propõe estudar o potencial *in vitro* de óleos essenciais e extratos vegetais para serem utilizados em terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre suspensões e biofilmes de micro-organismos de interesse médico-odontológico.

#### **4 CONCLUSÃO**

A terapia fotodinâmica tem se mostrado uma modalidade promissora para o tratamento de doenças causadas por micro-organismos, principalmente na área da Odontologia. A descoberta de produtos de origem vegetal para a utilização como fotossensibilizadores em TFD é grande valor, pois o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores é importante para aumentar a quantidade de recursos terapêuticos disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas.

## REFERÊNCIAS\*

1. Ferrari J, Vavre F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011. 12; 366 (1569): 1389-400.
2. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 2000. 17; 406(6797): 775-81.
3. Oshikawa TT. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50(7): S226-9.
4. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist Updat.* 2017; 31: 31-42.
5. Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer: basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* 2008; 10(3): 148-54.
6. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014; 32(3): 415-25.
7. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(1): 27-42.
8. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec.* 2017; 17(8): 775-802.
9. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001; 74(5): 656-69.
10. Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(4): 501-11.
11. Machado, AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova.* 2000; 23(2): 237-43.
12. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist.* 2006; 11: 1034-44.
13. Issa MCA, Boechat M, Fassini AC. Photodynamic therapy in Brazil: 10 years of history. *Surg Cosmet Dermatol.* 2016; 8(4 Supl. 1): S16-22.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials (Basel)*. 2013. 6; 6(3): 817-840
15. Scherer KM, Bisby RH, Botchway SW, Parker AW. New approaches to photodynamic therapy from types I, II and III to type IV using one or more photons. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017; 17: 171-89
16. Ribeiro MS, Silva DFT, Núñez SC, Zezell DM. *Treaty of aesthetic medicine*, second ed., São Paulo, Brazil, 2011.
17. 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.
18. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3(5): 436-50
19. Silva-Boghossian CM, Neves AB, Resende FA, Colombo AP. Suppuration-associated bacteria in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2013; 84(9): e9-e16.
20. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e108.
21. de Carvalho Baptista IM, Martinho FC, Nascimento GG, da Rocha Santos CE, Prado RFD, Valera MC. Colonization of oropharynx and lower respiratory tract in critical patients: Risk of ventilator-associated pneumonia. *Arch Oral Biol*. 2018; 85: 64-69.
22. Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5): 419-24.
23. Pileggi G, Wataha JC, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, Bouillaguet S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10(2): 134-40.
24. Gangcuangco LM, Alejandria M, Henson KE, Alfaraz L, Ata RM, Lopez M, Saniel M. Prevalence and risk factors for trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Escherichia coli* among women with acute uncomplicated urinary tract infection in a developing country. *Int J Infect Dis*. 2015; 34: 55-60.
25. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep*. 2014; 4: 6602.
26. Kim NJ, Ahn KB, Jeon JH, Yun CH, Finlay BB, Han SH. Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages. *Mol Immunol*. 2015; 65(1): 17-24.

27. World Health Organization (WHO) (2017). Sugars and Dental Caries. Geneva:WHO. [acesso em 08 de junho de 2018]. Disponível em: [http://www.who.int/oral\\_publications/sugars-dental-caries-keyfacts/en/](http://www.who.int/oral_publications/sugars-dental-caries-keyfacts/en/)
28. Fu XJ, Fang Y, Yao M. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed Res Int*. 2013;159157.
29. Iluz N, Maor Y, Keller N, Malik Z. The synergistic effect of PDT and oxacillin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Lasers Surg Med*. 2018; 50(5): 535-551.
30. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(1): 13-28.
31. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
32. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(12): 827-33.
33. Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(11): 627-32.
34. Araújo NC, de Menezes RF, Carneiro VSM, Dos Santos-Neto AP, Fontana CR, Bagnato VS, Harvey CM, Gerbi MEM. Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35(5): 259-263.
35. De Annunzio SR, Costa NCS, Mezzina RD, Graminha MAS, Fontana CR. Chlorin, phthalocyanine and porphyrin types derivatives in phototreatment of cutaneous manifestations: a review. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(16).
36. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2013; 10(3): 313-9.
37. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013; 51(3): 243-51.
38. Rego-Filho FG, de Araujo MT, de Oliveira KT, Bagnato VS. Validation of photodynamic action via photobleaching of a new curcumin-based composite with enhanced water solubility. *J Fluoresc*. 2014; 24(5): 1407-13.

39. da Silva AP, Carbinatto FM, Bagnato VS, Inada NM, A promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy, *J.Pharm. Pharmacol.* 2015; 3: 434–37.
40. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(8): 869-80.
41. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143-66.
42. Villacorta RB, Roque KFJ, Tapang GA, Jacinto SD. Plant extracts as natural photosensitizers in photodynamic therapy: in vitro activity against human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2017; 7(4): 358–66.
43. Marrelli M, Menichini G, Provenzano E, Conforti F. Applications of natural compounds in the photodynamic therapy of skin cancer. *Curr Med Chem.* 2014; 21(12): 1371-90.
44. Nakamura K, Ishiyama K, Sheng H, Ikai H, Kanno T, Niwano Y. Bactericidal Activity and Mechanism of Photoirradiated Polyphenols against Gram-Positive and -Negative Bacteria. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(35): 7707-13.
45. Ministério do Meio Ambiente. Caatinga. [acesso em 8 set. 2019]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>.