

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

FREDERICO MÜLLER

**“TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA CONTRA
BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
FOTOSENSIBILIZANTES”**

São José dos Campos, SP

2006

FREDERICO MÜLLER

“Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizantes”

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof Dr Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP

2006

M923t

Muller, Frederico

Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizantes./Frederico Muller. São José dos Campos. UniVap, 2006.

1 Disco laser: Color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Fotoquimioterapia 2. Bactérias Gram-positivas 3. Agentes Fotossensibilizantes I. Silva, Newton soares, Orient. II. Título

CDU: 541.14

Autorizo para fins acadêmicos e científicos a reprodução total ou parcial desta dissertação por meio fotocopiador ou eletrônico.

Aluno: *Frederico Muller*

Data: *08/12/06*

“TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FOTOSSENSIBILIZANTES”

Frederico Müller

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **MARCO ANTONIO DE OLIVEIRA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)

Profª. Dra. **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA** (UNESP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Antônio de Oliveira Muller e Maria Amélia Ribeiro Muller, à minha irmã Frida Muller e à minha avó Iva Pereira Ribeiro por todo o companheirismo, amor, carinho, confiança e incentivo em todos os momentos de minha caminhada.

Agradecimentos

“Ensinaste-me os caminhos da vida e me encherás de alegria com a vista de tua face”

(Atos dos Apóstolos, Capítulo 2, Versículo 28)

Começo agradecendo ao meu bom DEUS que por sua graça me concedeu o dom da vida e me inspira a ser, a cada dia, uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Antônio de Oliveira Muller e Maria Amélia Ribeiro Muller, que nunca deixaram de me apoiar, regando com doces palavras e carinho meus momentos de aflição e rogando a DEUS a minha felicidade.

À minha irmã, Frida Muller, por mostrar sempre interessada e pronta em ajudar-me.

À minha avó, Iva Pereira Ribeiro, que através de sua grande experiência de vida me ensinou a ser paciente e manter sempre a mente tranqüila.

Aos meus familiares e amigos que de alguma forma acreditaram no meu potencial e incentivaram para que esse meu sonho se realizasse.

Aos Professores Newton Soares da Silva e Cristina Pacheco Soares por todo o amparo e acolhida em seus ambientes de trabalho e por me mostrar o verdadeiro valor e sentido em fazer ciência.

Ao Laboratório de Microbiologia da UNIVAP pelo fornecimento de material e pela grande simpatia de sua equipe.

Ao grande amigo Vinícius Carneiro de Oliveira, principal envolvido em minha vida de mestrando, que sempre se fez muito útil no desenvolvimento dos meus trabalhos e juntos compartilhamos maravilhosos momentos.

À minha leal companheira Carolina Figueiredo, pelo seu amor, carinho, consideração, paciência, respeito, sinceridade, serenidade... Você é muito especial.

Ao pessoal do laboratório e de mestrado que cooperaram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Renata Amadei Nicolau que introduziu nos meus conhecimentos as noções mais atuais sobre LASER e mostrou-me com sua vida como ser dedicado ao trabalho.

Por fim agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por todo apoio.

“Devia ter amado mais, ter chorado mais, ter visto o sol nascer. Devia ter arriscado mais e até errado mais, ter feito mais do que eu poderia fazer...”

“Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizantes”

Resumo

A existência de resistência antibiótica entre bactérias patogênicas é iminente. Estudos para encontrar uma terapia alternativa antimicrobiana a qual bactérias não serão capazes de desenvolver resistência têm sido desenvolvidos. Esta terapia poderia ser através da combinação entre a luz e um agente fotossensibilizador, conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT). O objetivo desse estudo foi analisar a efetividade de dois fotossensibilizantes em induzir morte bacteriana na ausência ou presença de irradiação. Para tal foram utilizadas cepas de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*), os fotossensibilizantes azul de metileno (na concentração de 5,34 μ M) e cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada - AIPcS₄ (nas concentrações: 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) e um laser de diodo de baixa potência com meio ativo de Arsenieto de Gálio Alumínio (com 685 nm de comprimento de onda). Após crescimento *overnight* a 37° C, as amostras bacterianas foram diluídas e ressuspendidas em PBS, incubadas por uma hora com um dos agentes fotossensibilizantes seguidas ou não de irradiação com potência de 30 mW e densidade de energia de 4,5 J/cm², semeadas em placas de Petri com posterior incubação por 24 horas a 37° C para desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC). Foram observadas taxas variáveis de UFC nas diversas situações em que as bactérias foram submetidas. Para diferentes concentrações da AIPcS₄ com posterior irradiação, os valores de UFC foram menores quando comparados ao controle e foi observado que a indução de morte bacteriana foi diretamente proporcional à concentração utilizada e, na ausência de laser, as concentrações de AIPcS₄ não promoveram redução nos valores de UFC, não induzindo morte bacteriana. O azul de metileno, na concentração de 5,34 μ M, também foi eficaz em induzir morte bacteriana após irradiação, contudo ele promoveu reduções significativas nos valores de UFC de todas as bactérias estudadas na ausência de irradiação. Os dois fotossensibilizantes analisados foram eficazes em mediar a APDT na indução de morte bacteriana, sugerindo boa funcionalidade como alternativa para uma terapia antibiótica tópica. Apesar desses resultados experimentais promissores, somente uma controlada experimentação clínica pode provar a efetividade da APDT *in vivo*.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Azul de Metileno, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*.

**Antimicrobial photodynamic therapy against gram positive bacteria:
comparative study between photosensitizers**

Abstract

The existence of antimicrobial resistance between pathogenic bacteria is imminent. Studies to find antimicrobial therapy alternatives which bacteria will not be able to develop resistance have been carried. This therapy could be through the combination between the light and a photosensitizer agent, known as Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT). The aim of this study was to analyze the effectiveness of two photosensitizers to induce bacterial death in the absence or presence of irradiation. We used Gram+ bacteria strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*), the photosensitizers methylene blue (5,34 μM concentration) and chlorine-aluminum phthalocyanine tetrasulfonate - AIPcS₄ (concentrations: 10 μM , 20 μM , 30 μM and 40 μM) and a low power laser diode of Gallium Aluminum Arsenide (685 nm wavelength). After growth overnight at 37° C, the bacterial samples had been diluted and resuspended in PBS, incubated for one hour with AIPcS₄ or methylene blue followed or not of irradiation with power of 30 mW and density of 4,5 energy of J/cm², sown in Petri plates and incubated for 24 hours at 37° C for development of colonies formation units (CFU). Changeable numbers of CFU in the diverse situations submitted for the bacteria had been observed. For different concentrations of the AIPcS₄ followed irradiation, the values of CFU lesser when had been compared with the control and were observed that the induction of bacterial death was directly proportional to used concentration and the concentrations of AIPcS₄ had not promoted reduction in the values of CFU in the irradiation absence, not inducing bacterial death. The blue one of methylene, in the concentration of 5,34 μM , also was efficient in inducing bacterial death after irradiation, however it promoted significant reductions in the values of CFU of all the bacteria studied in the irradiation absence. The analyzed photosensitizers had been efficient in mediating the APDT in the induction of bacterial death, suggesting good functionality as alternative for a topic antibiotic therapy. The spite of these promising experimental results, a controlled clinical experimentation only can prove the effectiveness of the APDT *in vivo*.

Key Words: Photochemotherapy, Methylene Blue, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*

LISTA DE QUADROS

<i>Quadro 1: Parâmetros de irradiação do laser Arsenieto de Gálio Alumínio (GaAlAs).....</i>	<i>55</i>
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Curva de crescimento bacteriano.....57

Gráfico 2- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito do laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 μM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 μM + laser (Grupo4) de acordo com o controle (Grupo1) ($p < 0,05$).....60

Gráfico 3- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ com posterior irradiação laser: 10 μM de AIPcS₄ + Laser (Grupo5), 20 μM de AIPcS₄ + Laser (Grupo6), 30 μM de AIPcS₄+ Laser (Grupo7), 40 μM de AIPcS₄ + Laser (Grupo8) de acordo com o controle ($p < 0,05$).....61

Gráfico 4- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações da AIPcS₄ sem irradiação laser: 10 μM de AIPcS₄ (Grupo 9), 20 μM de AIPcS₄ (Grupo10), 30 μM de AIPcS₄ (Grupo11), 40 μM de AIPcS₄ (Grupo12) comparado ao controle (Grupo1)($p < 0,05$).....62

Gráfico 5- UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito da AIPcS₄ 40 μM sem laser (Grupo12), laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 μM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 μM + laser (Grupo4) de acordo com o controle ($p < 0,05$).....64

Gráfico 6- UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ com posterior irradiação laser: 10 μl de AIPcS₄ + Laser (Grupo5), 20 μl de AIPcS₄ + Laser (Grupo6), 30 μl de AIPcS₄ + Laser (Grupo7), 40 μl de AIPcS₄ + Laser (Grupo8) de acordo com o controle ($p < 0,05$)....65

Gráfico 7- UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito da AIPcS₄ 40 μM sem laser (Grupo12), laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 μM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 μM + laser (Grupo4) de acordo com o controle ($p < 0,05$).....67

Gráfico 8- UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ com posterior irradiação laser:10 μM de AIPcS₄ + Laser (Grupo5), 20 μM de AIPcS₄ + Laser (Grupo6), 30 μM de AIPcS₄ + Laser(Grupo7), 40 μM de AIPcS₄+Laser(Grupo8) de acordo com o controle ($p < 0,05$).....68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de formação dos produtos reativos das reações tipo I e tipo II a partir do fotossensibilizante (PS) no estado tripleto excitado.....36

Figura 2: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – Laser isolado; C – Azul de Metileno 5,34 μM sem laser; D - Azul de Metileno 5,34 μM + laser.....60

Figura 3: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS₄; C- 20 μM de AIPcS₄; D- 30 μM de AIPcS₄; E- 40 μM de AIPcS₄.....61

Figura 4: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ sem posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS₄; C- 20 μM de AIPcS₄; D- 30 μM de AIPcS₄; E- 40 μM de AIPcS₄.....62

Figura 5: UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – AIPcS₄ 40 μM sem laser; C – Laser isolado; D – Azul de Metileno 5,34 μM sem laser; E - Azul de Metileno 5,34 μM + laser.....64

Figura 6: UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS₄; C- 20 μM de AIPcS₄; D- 30 μM de AIPcS₄; E- 40 μM de AIPcS₄.....65

Figura 7: UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – AIPcS₄ 40 μM sem laser; C – Laser isolado; D – Azul de Metileno 5,34 μM sem laser; E - Azul de Metileno 5,34 μM + laser.....67

Figura 8: UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS₄; C- 20 μM de AIPcS₄; D- 30 μM de AIPcS₄; E- 40 μM de AIPcS₄....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vias fotocitotóxicas nas células microbianas44

Tabela 2: Susceptibilidade bacteriana frente a diferentes situações69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C- grau Celsius
AlPcS₄- cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada
AM- azul de metileno
APDT- terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATP- adenosina trifosfato
bact/ml- bactéria por mililitros
BHI- infusão de cérebro e coração
Ca²⁺- cálcio
CLTs- cadeias laterais tetrapeptídicas
cm- centímetro
DNA- ácido desoxi-ribonucleico
DO- densidade óptica
Fe²⁺- íon ferro reduzido
Fe³⁺- íon ferro
GaAsAl- arsenieto de gálio alumínio
H₂O- água
He-Ne- hélio-neônio
HPLT – laserterapia de alta potência
HO⁻ - íon hidroxil
HO[•]- radical hidroxil
HP- hematoporfirina
HPD- derivado da hematoporfirina
HSA- albumina sérica humana
J/cm²- Joules por centímetros quadrados
K⁺- íon potássio
L- laser
LASER- amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LPLT- laserterapia de baixa potência
LPS- lipopolissacarídeo
M/cm- molar por centímetro
MAS- “Mitis Salivarius Agar”
MDR- proteínas que expressam resistência a antibióticos
mg/kg- miligramas por quilograma
mg/ml- miligramas por mililitro
ml- mililitros
mM- milimolar
mm²- milímetros quadrados
MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
mW- miliwatts
mW/cm²- miliwatts por centímetros quadrados
Na⁺- íon sódio
NaCl- cloreto de sódio
NAG- N-acetil-glicosamina
NAM- ácido acetilmurâmico
NO⁻ - óxido nítrico

ns- nanosegundo
OONO⁻ - peróxidonitrito
P- fósforo
PBS- solução tampão fosfato de sódio
PDT- Terapia Fotodinâmica
PF-Photofrin
PS- fotossensibilizante
RB- Rose Bengal
ROO[•]- radical peroxil
rpm- rotações por minuto
SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD- superóxido desmutase
TBO- azul de Toluidina
TSA- ágar trípitico de soja
UFC- unidades formadoras de colônia
UV- ultravioleta
V- volt
?m- nanômetros
?- comprimento de onda
µg/ml- micrograma por mililitro
µl- microlitro
µm- micrometros
µM- micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Célula Bacteriana	19
2.2 Etiopatogênica das Bactérias Gram-positivas	22
2.2.1 Streptococos	22
2.2.2 Estafilococos Enterococos	23
2.2.3 Enterococos	24
2.3 Resistência Bacteriana	26
2.4 Laser de Baixa Potência e Terapia Fotodinâmica	30
2.4.1 Fotossensibilizadores	33
2.5 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	39
2.5.1 Ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	43
3. JUSTIFICATIVA	48
4. OBJETIVO GERAL	49
4.1 Objetivos Específicos	49
5. MATERIAL E MÉTODO	50
5.1 Material	50
5.2 Métodos	52
5.2.1 Curva de crescimento	52
5.2.2 Inóculo bacteriano	52
5.2.3 Preparo das Placas de Petri	53
5.2.4 Método de Gram	53
5.2.5 Contagem e diluição da cultura bacteriana	54
5.2.6 Distribuição das alíquotas e adição do fotossensibilizante	54
5.2.7 Irradiação das amostras	56
5.2.8 Semeadura das amostras em Placas de Petri	57
5.2.9 Método de leitura dos resultados	57
6. RESULTADOS	58
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são, indubitavelmente, as mais freqüentes na população humana. Nos últimos cinquenta anos, a investigação médica e farmacêutica conquistou importantes vitórias contra as doenças infecciosas. Com a produção industrial da penicilina e a vacinação em massa, muitas doenças deixaram de constituir uma ameaça para a vida humana. A "fronteira" da investigação continua aberta, confrontando-se com desafios cada vez mais importantes e, no terceiro milênio, este desafio entra numa fase crucial. O aparecimento recente da SIDA, o recrudescimento epidemiológico da tuberculose, a expansão de doenças bacterianas raras, a propagação de novas infecções virais e a crescente resistência de numerosas bactérias aos antibióticos, representam uma séria e real ameaça à saúde pública (JEVONS, 1991).

As infecções são doenças causadas por bactérias que existem no meio ambiente e dentro do nosso organismo. Essas bactérias podem produzir toxinas, que são nocivas para as células humanas e se um indivíduo não dispuser de uma resposta imune satisfatória contra elas, o resultado é a doença. As infecções adquiridas fora do meio hospitalar são, de forma geral, controladas com o uso de antibióticos. No entanto, isso não acontece com as infecções adquiridas nos hospitais, pois muitos dos microrganismos que vivem nos hospitais conseguem, por meio de alguns mecanismos, adquirir resistência a muitos antibióticos utilizados para os destruir. É fácil de perceber que as infecções hospitalares são geralmente mais difíceis de tratar do que as adquiridas fora do meio hospitalar (VERONESI et al., 1996).

São sugeridos tratamentos alternativos não só para controlar infecções por microrganismos resistentes a antibioticoterapia, mas para controlar qualquer tipo de

infecção, pois mecanismos de resistência podem se fazer presentes em qualquer espécie bacteriana o que dificultaria o tratamento (WISE et al., 1998 ; HART & KARIUKI, 1998).

Visto que a Terapia Fotodinâmica (PDT - do inglês *Photodynamic Therapy*) tem grande eficácia em induzir morte celular em procedimentos experimentais, muitos estudiosos também vêm aplicando tal terapia para induzir a morte de microrganismos patogênicos. Neste caso ela passaria a ser chamada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT - do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*) (MANYAK, 1990; WAINWRIGHT, 1998). Com a comprovação da eficiência da APDT, muitas infecções poderiam ser controladas sem muitas dificuldades e a morbidade que elas causam, em muitos pacientes, poderia ser contornada mais facilmente, devolvendo em um curto período a saúde aos enfermos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Célula bacteriana

As bactérias variam em espessura (entre 0,25 a 1,5 μm) e comprimento (entre 1 e 10 μm). São microrganismos unicelulares e dotados de uma estrutura elementar. Circulam em grande número no ar, no solo e na água; contudo, na maior parte dos casos, são inócuas, ou mesmo totalmente favoráveis ao homem: encarregam-se da decomposição e destruição das substâncias orgânicas e têm um papel importantíssimo nos processos químicos do solo. Algumas espécies estão normalmente presentes na pele, boca, brônquios e intestino, e não provocam doença. Em especial a flora bacteriana do intestino é útil, na medida em que produz vitaminas e protege da invasão pelas bactérias nocivas (MADIGAN, 2004; FUNKE, 2005).

Por serem organismos procariontes, não apresentam um núcleo definido, estando o seu material genético compactado e enovelado numa região do citoplasma chamada de nucleóide. As bactérias apresentam uma membrana plasmática recoberta por uma parede celular. Diferente das células eucarióticas, as bactérias não possuem organelas delimitadas por membranas (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2004).

A parede celular das bactérias é uma estrutura rígida, formada por um complexo mucopeptídico, que dá forma à bactéria. A cápsula, presente principalmente em bactérias patogênicas é formada por polissacarídeos e tem consistência de um muco. Tal estrutura mucosa confere resistência às bactérias patogênicas contra o ataque e englobamento por leucócitos e outros fagócitos,

protegendo-as de possíveis rupturas enzimáticas ou osmóticas.

As bactérias que habitam no corpo humano proliferam num ambiente quente e úmido. Algumas são aeróbias, o que quer dizer que necessitam de oxigênio para se desenvolverem e multiplicarem, situando-se, normalmente, na pele ou sistema respiratório. As bactérias anaeróbias proliferam onde não há oxigênio, ou seja, nas camadas profundas dos tecidos ou nas feridas (PELCZAR et al., 1997).

A coloração de Gram, assim designada em memória de Hans Christian Joachim Gram, que desenvolveu o procedimento em 1884, classifica as bactérias em Gram+ ou Gram- e continua a ser um dos métodos mais empregados para classificar as bactérias. Tal classificação se baseia na diferente constituição da parede celular de ambos os tipos bacterianos, pois este componente bacteriano determina como tais bactérias se coram (TRABULSI et al., 1999). Bactérias Gram- possuem uma parede celular composta de várias camadas que diferem na sua composição química sendo mais complexas que a parede celular de bactérias Gram+, que apesar de ser mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula.

A rigidez da parede celular é devido a substância peptídeoglicano, representando a maior parte da parede de Gram+, ao passo que em Gram- ocupa um pequeno espaço. O peptídeoglicano é uma macromolécula formada por um arcabouço composto por uma alternância de N-acetil-glicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). A este último encontram-se ligadas covalentemente cadeias laterais de tetrapeptídeos (CLTs). As CLTs podem ligar-se diretamente como nas Gram- ou por meio de outros aminoácidos como nas Gram+. Nestas últimas o número de interligações é bem maior (NISENGARD e NEWMAN, 1994).

Os componentes característicos da parede de bactérias Gram+ são os ácidos

teicóicos que estão ligados ao peptídeoglicano e os ácidos lipoteicóicos que apesar de serem encontrados ao longo da parede, encontram-se intimamente ligados à porção lipídica da membrana citoplasmática. Esses componentes são os responsáveis em facilitar a ligação e a regularização da entrada e saída de cátions da bactéria (TRABULSI et al., 1999).

Já as bactérias Gram- apresentam uma parede celular mais complexa, formada por uma ou por poucas camadas de peptídeoglicano e por uma membrana externa. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de periplasma ou espaço periplasmático. O peptídeoglicano se liga à membrana externa por uma lipoproteína e está embebido no gel do periplasma que contém alta concentração de enzimas degradadoras e proteínas de transporte. Os ácidos teicóicos não estão presentes. A membrana externa é formada de dupla camada lipídica, possui uma camada interna de fosfolipídios, e uma externa com lipopolissacarídeos e proteínas. As principais proteínas da membrana externa são as porinas e estas formam poros propiciando assim a passagem passiva de solutos; as lipoproteínas com função estrutural, cuja parte protéica está covalentemente ligada ao peptídeoglicano e à parte lipídica imersa na camada interna de fosfolipídios da membrana externa (MADIGAN, MARTINKO ; PARKER, 2004).

A membrana externa das Gram- constitui uma barreira adicional à entrada de alguns antibióticos, lisozimas, sais de bile, enzimas digestivas e muitos corantes. Esta permeabilidade parcialmente seletiva é determinada principalmente pelas porinas e é regulada pelo tamanho da molécula, não sendo específica. O periplasma possui, além de peptídeoglicano, enzimas e proteínas, como as enzimas hidrolíticas (proteases, nucleases, lípases) responsáveis pela quebra de macromoléculas, às quais a membrana citoplasmática é impermeável. Produzem, assim, moléculas

menores que podem ser transportadas para o interior da bactéria. No periplasma são encontradas também enzimas capazes de inativar drogas, tornando as bactérias resistentes a elas, como as betalactamases que inativam penicilinas.

2.2 Etiopatogênia das Bactérias Gram-positivas

2.2.1 Estreptococos

Estas bactérias crescem em cadeias, de comprimento variável, e são responsáveis por infecções distintas. Embora classificados como aeróbios, a maioria é anaeróbio facultativa (capazes de crescer em um ambiente com considerável concentração de oxigênio), enquanto que alguns são anaeróbios obrigatórios (VERONESI et al., 1996).

As superfícies da cavidade oral são constantemente colonizadas por microrganismos, sendo que os estreptococos constituem parte essencial dessa microbiota. Nas superfícies dos dentes não ocorre nenhuma renovação epitelial, o que contribui para que esses microrganismos possam colonizar e crescer nessas superfícies. Muitos estudos foram realizados na tentativa de demonstrar que os estreptococos cariogênicos condiziam com a descrição do *Streptococcus mutans*, justificando o fato de que esta espécie de microrganismo está relacionada à cárie dental, sendo o seu principal agente etiológico e podendo ser isolado de placas dentais ou da saliva de indivíduos cárie-ativos. (LOESCHE, 1993).

O *Streptococcus mutans* é um microrganismo que apresenta capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, e polissacarídeos intracelulares a partir de carboidratos fermentáveis. Pode ser prontamente identificado em meios de cultura sólidos (com altas concentrações de

sacarose), onde forma colônias elevadas e irregulares (SVENSATER et al., 2001). Esta espécie geralmente coloniza a superfície dental, sendo que a área de maior frequência de localização é a região mais apical dos pontos de contato entre os dentes.

2.2.2 Estafilococos

Os estafilococos são bactérias esféricas que, à microscopia, aparecem como “cachos de uva”. São anaeróbios facultativos podendo crescer pela fosforilação oxidativa ou pela fermentação do ácido láctico (TRABULSI et al., 1999).

Estas bactérias estão entre as bactérias mais resistentes que não formam esporos e podem sobreviver em muitas situações não fisiológicas. Normalmente, encontram-se nas narinas e na pele de 20% a 30% dos adultos saudáveis. Podem também ser encontradas, embora menos freqüentemente, na boca, glândulas mamárias, sistemas genito-urinário, intestinal e respiratório superior. As infecções por estafilococos são freqüentemente supurativas (com produção de pus) e têm sido implicadas em muitos tipos diferentes de infecções (NISENGARD ; NEWMAN, 1994).

Um de seus integrantes mais conhecidos, o *Staphylococcus aureus* é responsável por provocar uma variedade de infecções, onde quadros supurativos são freqüentes. Causa lesões superficiais na pele como os furúnculos; infecções mais sérias tais como a pneumonia, infecções das vias aéreas superiores, mastite, flebite, meningite, septicemia; infecções do trato urinário; além de osteomielite e endocardite. Ele é a causa principal da infecção hospitalar de feridas cirúrgicas (infecção nosocomial). (FUNKE, TORTUGA ; CASE, 2005).

Ele expressa muitos fatores potencialmente virulentos: (1) proteínas de superfície que promovem a colonização de tecidos do hospedeiro; (2) fatores de superfície que inibem a atividade fagocítica (cápsula, proteína A); (3) propriedades bioquímicas que realçam sua sobrevivência nos fagócitos (como a produção de catalase); (4) proteção contra resposta imune (proteína A, coagulase); (5) toxinas prejudiciais à membrana promovendo lise de membranas de células eucariontes (hemolisinas, leucotoxinas, leucocidinas); (6) exotoxinas que provocam danos aos tecidos do hospedeiro, (7) resistência inerente e adquirida aos agentes antimicrobianos (VERONESI et al., 1996).

Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) causam infecções significativas e morbidade em muitos pacientes e constituem um importante agente etiológico de infecções hospitalares (JEVONS, 1991). Muitas infecções são difíceis de tratar e pacientes infectados por muito tempo requerem longa permanência hospitalar.

2.2.3 Enterococos

Estas bactérias, antes classificados como estreptococos do Grupo D ocorrem em cocos individuais, aos pares e em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, que podem crescer em condições extremas e numa grande variedade de meios, incluindo solo, alimentos, água e em muitos animais. O seu habitat natural parece ser o tubo digestivo dos animais, incluindo o do homem, onde representam uma porção significativa da flora normal. Pode também ser encontrado, em menor número, nas secreções orofaríngeas e vaginais (FUNKE, TORTUGA ; CASE, 2005).

Por viver mais tempo na água do que os coliformes, o enterococos é

considerado pela Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos, como indicador mais preciso de doenças transmitidas pelo contato com a água (SADER, 2002). As infecções por enterococos ocorrem em doentes internados, freqüentemente após cirurgia ou instrumentação. Os enterococos podem causar superinfecções em doentes internados, sob terapêutica antibiótica. A superinfecção pode ocorrer quando os antibióticos alteram o equilíbrio bacteriano no organismo, permitindo o crescimento dos agentes oportunistas. A superinfecção pode ser muito difícil de tratar, porque é necessário optar por antibióticos eficazes contra todos os seus agentes etiológicos (MUTO et al., 2003).

Os *Enterococcus faecalis* pode causar septicemia, infecção do trato urinário, infecção das vias respiratórias nos pacientes com o sistema imune comprometido e estão associadas a infecções de canais radiculares dos dentes. Algumas linhagens ultra-resistentes não podem ser tratadas com drogas (NISENGARD;NEWMAN, 1994).

É imprescindível destacar que as infecções endodônticas com *Enterococcus faecalis* podem representar um problema para o tratamento devido à dificuldade de eliminá-lo do sistema de canais radiculares. Isso ocorre por esse microrganismo poder existir como cultura pura, sem o suporte de outra bactéria. Além disso, apresenta a capacidade de ocupar nichos ecológicos criados pela remoção de outros microrganismos e a capacidade de crescer em um ambiente pobre em nutrientes (SUNDQVIST et al., 1998). Ainda, é de extrema importância acrescentar que esse microrganismo possui a capacidade de sobreviver em um pH de 11.5, tal fato pode contribuir para a ocorrência de re-infecção e reabsorção radicular inflamatória (HAN et al., 2001).

2.3 Resistência Bacteriana

Existem três condições que devem ser preenchidas para que um antibacteriano iniba ou elimine uma bactéria: I) a existência de um alvo, II) o antibacteriano deve ter a capacidade de atingir o alvo e III) não pode ser inativado antes de atingi-lo. As bactérias podem ser classificadas como sensíveis ou resistentes a antibióticos. Em geral classificam-se como resistentes as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações em que o antibiótico atinge no sangue quando administrados nas recomendações de uso clínico. A resistência pode ser natural ou adquirida. O antimicrobiano não induz a resistência, mas seleciona as bactérias mais resistentes existentes em uma população (SVENSATER et al., 2001)..

A aquisição de resistência por uma bactéria sensível é decorrente de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. As alterações genéticas podem ser originadas de mutações cromossômicas, pela aquisição de plasmídeos de resistência ou por transposons. A resistência mediada por mutações é geralmente simples, isto é, atinge apenas um antibacteriano, porque dificilmente uma bactéria sofre mutações simultâneas para dois ou mais antibacterianos. A mediada por plasmídeos de resistência pode ser simples, mas na maioria das vezes é múltipla, tornando as bactérias resistentes a dois ou mais antibióticos. Isto se deve a presença de genes de resistência, para diferentes antibacterianos, em um só plasmídeo. Pode-se ter também a presença de dois ou mais plasmídeos de resistência diferentes numa mesma bactéria. Tanto a resistência cromossômica como a extracromossômica podem ser transferidas de uma bactéria para outra (MURRAY et al., 1992).

São vários os mecanismos químicos que podem tornar as bactérias resistentes: produção de enzimas que codificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; diminuição da permeabilidade à entrada de antibacterianos; alteração do alvo: síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano; expulsão do antimicrobiano da bactéria (TRABULSI et al., 1999).

A descoberta de antimicrobianos peptídicos oferece uma ótima oportunidade para combater microrganismos patogênicos. A aquisição de resistência para antimicrobianos peptídicos em amostras susceptíveis é mais lenta e menos comum quando comparado com outros agentes antimicrobianos. As cargas positivas e a habilidade para adotar uma estrutura anfipática são as propriedades que realçam a afinidade dos peptídeos com os fosfolipídios carregados negativamente da superfície da membrana das bactérias. Os peptídeos interferem com a integridade da membrana e assim podem afetar seus alvos citoplasmáticos. Em vertebrados, antimicrobianos peptídicos são sintetizados e secretados por células fagocíticas e células epiteliais e contribuem para a resposta imune inata. (ZASLOFF, 2002).

Evidências atuais mostram que as bactérias do biofilme estão em um estado fisiológico que as tornam menos susceptíveis a agentes antimicrobianos. O acúmulo do complexo biofilme bacteriano na superfície dentária contribui para que as bactérias residentes sobrevivam às forças de remoção e também contribui para a proteção das bactérias contra mecanismos de defesa específicos e não-específicos do hospedeiro. Os mecanismos de resistência também incluem barreiras de difusão físicas ou químicas para a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, crescimento do biofilme em regiões com limitação de nutrientes, ativação de respostas ao estresse oxidativo e o desenvolvimento de fenótipos biofilme-específicos (DAVEY ; O'TOOLE, 2000; MAH ; JIANG, 2001).

O tratamento atual das enfermidades associadas à placa envolve a remoção mecânica do biofilme e o uso de anti-sépticos e antibióticos. Contudo, o desenvolvimento de resistência antibiótica de bactérias patogênicas conduziu a novas pesquisas com a finalidade de descobrir alternativas terapêuticas antibacterianas as quais bactérias não desenvolvam resistência (HAMBLIN et al., 2002).

O aumento dos problemas relacionados a microrganismos resistentes é particularmente importante quando existe alteração na resposta imune, como consequência de terapias imunossupressoras ou uma síndrome de imunodeficiência. As principais infecções mediadas por estafilococos e enterococos possuem grande facilidade em adquirir resistência a uma larga escala de agentes quimioterápicos. A vancomicina e antibióticos glicopeptídicos são opções efetivas no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), mas cepas resistentes a vancomicina de *Enterococcus faecalis* são atualmente responsáveis em causar infecções nosocomiais. A resistência a glicopeptídeos de enterococos é devida a uma modificação da parede bacteriana. Atualmente, embora existam algumas terapias alternativas eficazes no tratamento de infecções mediadas por microrganismos resistentes, a busca contínua por novas terapias é imperativa (WOODFORD, 1998). Recentemente foi reportada a atividade antibacteriana de cátions heterocíclicos que mostraram aumento em suas atividades frente a iluminação de baixa potência. Esta atividade de foto-inativação foi observada contra várias bactérias patogênicas incluindo cepas de MRSA (WAINWRIGHT, 1998).

Muitas infecções hospitalares são provocadas por *Staphylococcus aureus* e eles são capazes de adquirir resistência a uma variedade de antibióticos. Alguns são resistentes a quase todos antibióticos úteis clinicamente com exceção da

vancomicina, mas já existem relatos de amostras de *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistentes. A resistência a metilina se difunde com rapidez, pois as bactérias se multiplicam rapidamente e levam consigo tal característica. Um plasmídeo associado com a resistência a vancomicina foi detectado em *Enterococcus faecalis* que pode ser transferido ao *Staphylococcus aureus* no laboratório. Existem evidências que esta transferência pode ocorrer naturalmente (por exemplo, no trato gastrointestinal). Além disso, a resistência do *Staphylococcus aureus* aos antisépticos e aos desinfetantes, tais como compostos de amônia quaternária, pode ajudar na sua sobrevivência no ambiente hospitalar (LIVERMORE, 2000; MUTO et al., 2003).

É neste contexto que, na busca incansável de alternativas para ação antimicrobiana no combate a microrganismo resistentes, se insere a terapia fotodinâmica antimicrobiana

2.4 Laser de baixa potência e Terapia Fotodinâmica

A laserterapia vem conquistando um grande espaço na odontologia moderna, juntamente com a evolução dos materiais e técnicas. De uma maneira geral este avanço tecnológico vem contribuindo não somente na redução do tempo de trabalho clínico, mas também em aspectos biológicos do tratamento, como na redução significativa dos microrganismos orais que por ventura possam desenvolver um quadro patológico (ALMEIDA-LOPES, 1999).

De origem da língua inglesa, a palavra laser é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Tal radiação é eletromagnética não-ionizante, com características bastantes distintas. A radiação laser apresenta coerência temporal e

espacial, ou seja, propaga-se com a mesma fase no tempo e espaço, ela é dita monocromática por apresentar um único comprimento de onda e concentra uma alta densidade de energia em pequenos pontos (BRUGNERA-JR ; PINHEIRO, 1998).

Quando o laser incide no tecido ele pode ser refletido, absorvido, transmitido ou espalhado. O comprimento de onda do laser determina a absorção seletiva pelos tecidos, ou seja, para cada comprimento de onda existe um tipo diferente de interação entre o tecido e o laser (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

A laserterapia é dividida em dois sistemas quanto a potência dos aparelhos: a terapia laser de baixa potência (LPLT – “Low Power Laser Therapy”) e a de alta potência (HPLT – “High Power Laser Therapy”).

Os lasers de baixa potência possuem uma potência média de 30 a 100 mW, sendo seu modo de emissão contínuo ou pulsátil e comprimentos de onda que variam entre 630 a 904 nm. Seus efeitos em tecidos não são térmicos, sendo o aquecimento produzido por eles muito insignificante, de 0,1 a 0,5° C. Suas aplicações principais estão baseadas na quantidade de luz absorvida, para desta forma produzir reações fotoquímicas e ou fotofísicas. Os lasers de alta potência ou lasers cirúrgicos são aqueles que emitem potências maiores que os primeiros e são indicados para procedimentos cirúrgicos, podendo causar danos térmicos ao tecido alvo (KURACHI et al., 2002)..

Define-se a LPLT como um tipo de terapia capaz de causar alterações celulares e teciduais, gerados pelo processo de biomodulação, ou seja, pode promover a ativação ou inativação de processos metabólicos e não envolve as propriedades térmicas do laser (BRUGNERA-JR ; PINHEIRO, 1998).

O laser de baixa potência além de possuir a propriedade de biomodulação, também possui propriedade regeneradora e cicatricial. Mas quando em associação

com um agente fotossensibilizador, tal laser adquire a propriedade de provocar morte celular pela produção de produtos altamente reativos caracterizando a Terapia Fotodinâmica (PDT) (KURACHI et al., 2002).

A PDT pode ser definida como a administração de uma droga não tóxica ou um corante que é chamado de fotossensibilizante podendo ser administrado sistemicamente, localmente ou topicamente em um paciente portador de uma lesão (cancerígena ou não), deixando encubar por um tempo determinado seguido de iluminação da lesão por luz visível (normalmente com comprimento de onda que abrange a região do vermelho), e na presença de oxigênio, conduz a geração de produtos citotóxicos levando conseqüentemente a morte celular e destruição tecidual (BOYLE ; DOLPHIN, 1996).

As primeiras fontes de luz utilizadas foram as lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática associadas, na maioria das vezes a um componente térmico. Com o desenvolvimento da tecnologia laser, obteve-se uma luz monocromática, com comprimento de onda específico, grande densidade de energia, dose de irradiação bem controlada e sistema de entrega através de fibras ópticas. Em paralelo com a evolução química dos fotossensibilizantes, estudos foram realizados para desenvolver novas fontes de luz. Os avanços no conhecimento do sistema óptico do tecido permitiram que grandes melhorias fossem realizadas no plano de tratamento (BRANCALEON ; MOSELEY, 2002).

Um dos principais motivos de usar a PDT como uma terapia é a concepção de sua seletividade. Efeitos colaterais podem ser minimizados aumentando o acúmulo seletivo do fotossensibilizante em células-alvo, e pela distribuição focalizada e confinada da luz. Não obstante, a PDT pode levar a alguns efeitos adversos incluindo longa duração da fotossensibilidade da pele, ocasionalmente

distúrbios sistêmicos e metabólicos e destruição tecidual excessiva do local tratado (ORENSTEIN et al., 1996).

2.5.1 Fotossensibilizadores

Por volta de 1960 alguns estudos mencionaram o uso de hematoporfirina (HP) e porfirinas e sua localização seletiva em tumores que regrediam após exposição à luz visível. Nesta mesma época foi descoberto o derivado da hematoporfirina (HPD) que foi de grande utilidade para o aprimoramento da PDT. Um preparado semi-purificado de HPD conhecido como Photofrin[®] (PF), foi o primeiro fotossensibilizante a obter aprovação e regulamentação para ser usado como coadjuvante no tratamento de vários cânceres em muitos países. Após a realização de procedimentos experimentais com a finalidade de tratar tumores com HPD-PDT, foram observadas algumas desvantagens, incluindo: prolongada sensibilidade da pele, necessitando evitar luz solar por algumas semanas, pobre penetração da luz dentro do tumor devido aos comprimentos de onda usados, dentre outras (BAAS et al., 1995).

Estudos têm sido feitos para desenvolver novos fotossensibilizantes, e atualmente existe um grande número de fotossensibilizantes para serem empregados na PDT. Contudo, existe a dificuldade em se escolher qual o fotossensibilizante que apresenta melhor eficiência em uma determinada patologia. Alguns fotossensibilizantes podem ser facilmente preparados a partir de síntese parcial de materiais que existem em abundância na natureza, favorecendo economicamente e conferindo-lhe vantagens quando comparado com a síntese química total (BAAS et al., 1995).

As características do fotossensibilizante ideal têm sido discutidas em recentes estudos (DETTY et al. 2004; ALLISON et al., 2004). Eles devem ter baixos níveis de toxicidade local na ausência de irradiação e baixa incidência de toxicidade quando administrado sistemicamente e devem absorver luz em comprimentos de onda que abrangem a região do vermelho ou do infravermelho próximo para penetrar nos tecidos.

Muitos dos fotossensibilizantes usados clínica e experimentalmente são derivados de núcleos aromáticos tetrapirrólicos, encontrados na natureza na forma de pigmentos. As porfirinas naturais são núcleos tetrapirrólicos totalmente conjugados (não-reduzidos) e variam em número e tipo de ligações, particularmente com moléculas do ácido carboxílico (por exemplo, a coproporfirina tem quatro ligações com o ácido carboxílico e a protoporfirina tem duas). As porfirinas têm sua faixa de absorção na região de 630 nm de comprimento de onda. As clorinas são núcleos tetrapirrólicos, com uma dupla ligação em um reduzido anel pirrólico, conferindo uma faixa de absorção num comprimento de onda maior, que varia na região entre 650 e 690 nm (NYMAN ;;HYNNINEN, 2004).

Um outro grupo de fotossensibilizantes largamente estudado é o das ftalocianinas (FINGAR et al., 1993). Sua absorção se dá na faixa de 650 a 700 nm, com uma respeitável magnitude. Ela é representada quimicamente por 4 grupos fenil, mas estes possuem a desvantagem de serem insolúveis em água e terem dificuldade de agregação. Para minimizar tais desvantagens, foram incluídas nas moléculas das ftalocianinas íons de metal como o alumínio, zinco, dentre outros. Novos estudos indicaram que as ftalocianinas tetrasulfonadas possuem características favoráveis como intensa absorção na faixa do vermelho visível e longa permanência no estado ativado (SMETANA et al., 1994).

Outra classe de fotossensibilizantes inclui componentes completamente sintéticos, não ocorrendo naturalmente, conjugados a um sistema de anéis pirrólicos. Esses grupos incluem as fenotiazinas, e têm sido estudados também seus derivados não-tetrapirrólicos. Os exemplos desses grupos são o azul de toluidina, o azul de metileno e a “Rose Bengal”. Estes compostos têm sido largamente estudados como agentes para mediar foto-inativação antimicrobiana e também para mediar a morte de células neoplásicas em mamíferos (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Muitos destes compostos são lipofílicos e alguns são igualmente insolúveis em água. Embora se realizem muitos estudos nesta área, os aspectos moleculares estruturais para sintetizar o fotossensibilizante ideal, com grande seletividade para tumores, lesões teciduais ou microrganismos patogênicos, com alto nível de fototoxicidade para uma limitada área, são ainda desconhecidos.

Para escolher um dos muitos fotossensibilizantes que existem no mercado, é necessário entender alguns dos mecanismos de como o fotossensibilizante se comporta frente a irradiação e o que acontece com eles quando são colocados em contato com células. A maneira precisa como a PDT influencia as células é controlado, na maioria dos casos, pela localização do fotossensibilizante dentro da mesma. Esta localização é determinada pela sua natureza química (peso molecular, lipofilicidade, anfifilicidade, carga iônica e características da proteína de ligação), pela sua concentração, o tempo de incubação, e o fenótipo da célula alvo (NYMAN e HYNNINEN, 2004).

Os fenômenos fotofísicos envolvendo os fotossensibilizantes são explicados da seguinte forma: seu estado desativado mostra 2 elétrons com cargas opostas (isto é conhecido como estado singleto) em uma órbita molecular de baixa energia. Quando ocorre o contato com a luz e esta é absorvida na forma de fótons, um de

seus elétrons é impulsionado para uma órbita de alta energia, mas mantendo sua carga (primeiro estado singleto ativado) e isto acontece muito rapidamente (em nanosegundos). O estado singleto ativado pode levar a um processo conhecido como cruzamento de intersistemas por meio do qual a carga de um elétron excitado inverte para uma meia vida relativamente mais longa (em microsegundos) passando para estado tripleto excitado, que possui cargas de elétrons paralelas (CASTANO et al., 2004).

O fotossensibilizante (PS) no estado tripleto excitado pode submeter a 2 tipos de reações (figura 1). A reação tipo I freqüentemente envolve produção inicial de ânion superóxido por transferência de elétron do fotossensibilizante no estado tripleto para o oxigênio molecular e a reação tipo II é caracterizada pela transferência de energia do PS no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular para formar oxigênio singleto no estado ativado (BILSKI et al., 1993; MA e JIANG, 2001). Tal oxigênio reativo juntamente com outros radicais livres produzidos pela reação tipo I podem diretamente reagir com muitas moléculas celulares, como, por exemplo, moléculas de uma proteína, promovendo danos a ela por oxidação (GRUNE et al., 2001). Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente, e a relação entre esses dois processos depende do tipo de fotossensibilizante usado, da concentração do substrato e do oxigênio.

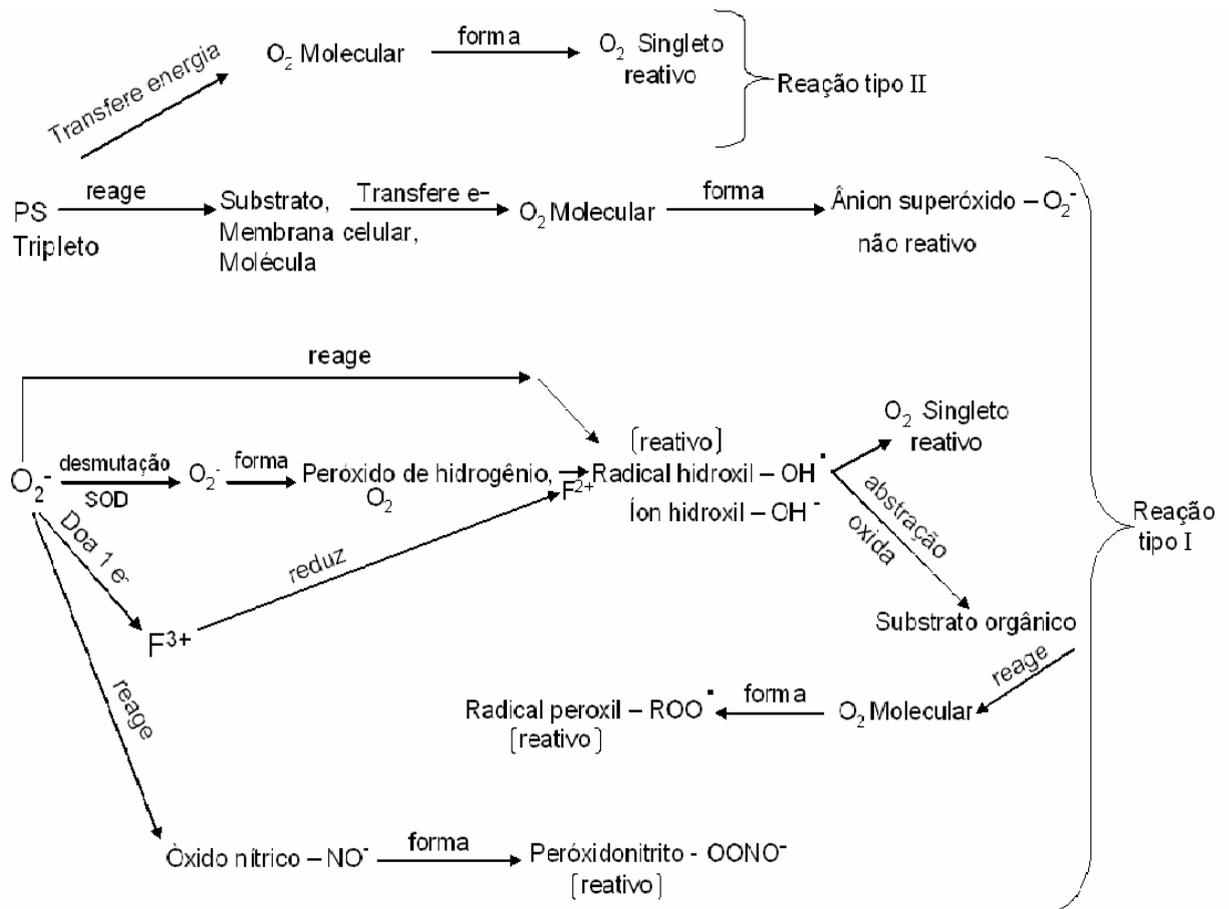


Figura 1: Mecanismo de formação dos produtos reativos das reações tipo I e tipo II a partir do fotossensibilizante (PS) no estado tripleto excitado.

Por causa da alta reatividade e o curto tempo de meia vida do oxigênio singlete e radicais hidroxil, somente moléculas e estruturas que estão próximas à área de sua produção (áreas onde o fotossensibilizante está localizado) são diretamente afetadas pela PDT. A vida média do oxigênio singlete em sistemas biológicos é menor que 40 ns (MOAN e BERG, 1991).

É sabido que os produtos reativos da PDT possuem um curto tempo de meia vida e sua ação se dá no local de sua geração, mas em determinadas ocasiões o tipo de dano que pode ocorrer em células carregadas com um fotossensibilizante e

submetidos a iluminação depende da sua localização subcelular. O entendimento das principais localizações dele é importante para se chegar a conclusão de qual deles é o mais efetivo para cada situação. A microscopia confocal por fluorescência é muito utilizada para determinar a localização intracelular de muitos fotossensibilizantes. A localização subcelular é investigada com diferentes emissões de fluorescência, onde ser usada para identificar os sítios de localização do fotossensibilizante, além dos locais que sofrem os danos após irradiação (KESSEL et al., 1997).

A distribuição intracelular em culturas de células pode ser determinada por uma escala de fotossensibilizantes com estruturas extensamente diferentes. As características estruturais importantes relativas aos fotossensibilizantes que lhes conferem absorção celular são: a) possuir uma carga iônica à qual pode mudar de um ânion (-4) para um cátion (+4); b) possuir um grau de hidrofobicidade expressada como o logarítmico do coeficiente de partição octanol/água; c) possuir um grau de simetria molecular. Fotossensibilizante que são hidrofóbicos e possuem 2 ou menos cargas negativas podem difundir através da membrana plasmática, e então localizar em outra membrana intracelular. Estes fotossensibilizantes também tendem a uma maior concentração dentro de células *in vitro*, especialmente quando estão presentes em baixas concentrações em um meio de cultura. Os que são menos hidrofóbicos e possuem mais que duas cargas negativas tendem a ser polares, para assim difundirem com mais facilidade através da membrana plasmática e eles são englobados por endocitose (CASTANO et al., 2004).

O fato de muitos fotossensibilizantes serem fluorescentes assim como ativados fotoquimicamente, significa que estratégias de imagem e detecção podem ser aplicadas nos protocolos da PDT. Por exemplo, mensurações de fluorescência

podem ser feitas para quantificar a concentração real de fotossensibilizante numa lesão antes de decidir quais os parâmetros apropriados de irradiação (BRANCALEON ; MOSELEY, 2002).

2.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT)

A APDT parece ser dotada de diversas características favoráveis para o tratamento de infecções microbianas localizadas, especialmente após o advento dos agentes fotossensibilizantes catiônicos (as fenotiazinas, porfirinas meso-substituídas, clorinas conjugados a poli-L-lisina) que interagem com a parede externa da superfície de diversos tipos de células bacterianas e de fungos, aumentando sua permeabilidade, e permitindo que quantidades significativas do fotossensibilizante sejam acumuladas na membrana citoplasmáticas. Estes fotossensibilizantes são caracterizados por um largo espectro de atividade, sendo eficazes contra bactérias gram-negativas e gram-positivas antibiótico-resistentes e fungos. Em geral, a morte extensa de patógenos pode ser conseguida sob leves condições de irradiação, com tempos curtos de incubação, que garantem um elevado grau de seletividade por bactérias em comparação com os principais constituintes dos tecidos do hospedeiro, tais como queratinócitos e fibroblastos. Além disso, a inativação de microrganismos pela fotossensibilização é tipicamente um processo multi-alvo, conseqüentemente, a seleção de patógenos foto-resistentes é muito improvável e não foi observada experimentalmente (MAISCH et al., 2005).

Wainwright (1998) comentou sobre a resistência na aceitação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT), apesar da rápida aceitação clínica da terapia fotodinâmica (PDT) contra células cancerígenas. Assim como a PDT, a APDT utiliza

fotossensibilizadores e luz visível na região do vermelho ou luz infravermelha a fim de promover uma resposta fotocitotóxica, normalmente através de danos oxidativos. Foi atribuído como principal utilização da APDT a inativação viral, embora existissem protocolos para tratamento de infecção oral. Tal protocolo foi mostrado com sendo eficaz *in vitro* no combate a bactérias (incluindo aquelas resistentes a drogas), fungos, vírus e parasitas.

A proposta de se utilizar a APDT em estudos cutâneos *in vivo* foi divulgada por Zeina et al. (2002), mas para isso requereria um procedimento terapêutico onde as bactérias poderiam ser mortas sem prejudicar o tecido adjacente. Eles analisaram, *in vitro*, a existência de algum efeito citotóxico em queratinócitos com o uso da APDT. Taxas de morte foram determinadas para uma linhagem de queratinócitos humanos (H103) usando azul de *trypan* e corante de vermelho neutro nos testes de viabilidade. Através dos seus resultados foi sugerido que *in vivo*, a APDT poderia ser eficiente em reduzir bactérias da pele não induzindo efeitos citotóxicos em queratinócitos.

Rovaldi et al. (2000) analisaram a eficiência da APDT na doença periodontal, comparando a ação de dois agentes fotossensibilizantes derivados da porfirina. Um desses derivados foi o clorina e6, o qual mostrou, *in vitro*, atividade contra um limitado grupo de bactérias periodontopatogênicas. A partir disso, eles projetaram um derivado porfirínico conjugado à pentalisina, para que a molécula obtivesse um maior espectro de ação. O clorina e6 conjugado a pentalisina mostrou, *in vitro*, atividade contra todos os microrganismos orais testados, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*. Portanto, o chlorin e6 conjugado a pentalisina reduziu mais eficazmente as bactérias

periodontopatogênicas, podendo ser uma ferramenta significativa para o tratamento da doença periodontal, mas estudos *in vivo* são necessários.

A existência de microrganismos resistentes a antibióticoterapia determina a necessidade em se desenvolver estratégias antimicrobianas alternativas. Embora a APDT seja usada por muitos pesquisadores para inativar bactérias *in vitro*, o uso desta terapia foi raramente relatado em trabalhos envolvendo modelos animais de infecção. Então Gad et al. (2004) descreveram o primeiro uso da APDT para tratar infecções mediadas por bactérias Gram-negativas em feridas excisionais em ratos. O resultado desse experimento foi bastante satisfatório e eles sugeriram que a APDT pode ser aplicada em infecções teciduais leves mediadas por microrganismos resistentes a antibióticoterapia.

Zeina et al. (2001) comentaram sobre os avanços no desenvolvimento da APDT. Seus estudos basearam-se na utilização do azul de metileno em combinação com a luz laser em amostras de microrganismos da pele. Usando condições de intensidade de luz padronizadas (densidade de potência de $42\text{mW}/\text{cm}^2$) e azul de metileno ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$), o número de mortes foi determinado contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans*. A taxa de morte de *Staphylococcus epidermidis* mostrou que tal resultado é diretamente proporcional à intensidade da luz. Uma elevada taxa de morte celular foi também obtida usando apenas luz solar.

Lambrechts et al. (2005) preocupados com a ascensão de múltiplas bactérias resistentes a antibióticos, viram a necessidade de se pesquisar terapias antimicrobianas alternativas para tratar infecções. Então eles analisaram o efeito do laser associado a um agente fotossensibilizante, no combate a tais microrganismos.

Seus estudos foram baseados no tratamento de feridas de queimadura em ratos infectadas com *Staphylococcus aureus*. O laser usado isoladamente ou em associação com o fotossensibilizante foi eficaz em adiantar a cicatrização da ferida, sendo sugerido que PDT é eficiente em reduzir rapidamente a concentração de bactérias em queimaduras infectadas.

Chabrier-Rosello et al. (2005) analisaram o efeito proposto pela APDT em infecções mucocutâneas e cutâneas mediadas por *Candida albicans*. Em seus estudos, os autores se basearam nas já conhecidas ações fotodinâmicas do Photofrin® como agente fotossensibilizante, e a partir disso quiseram elucidar mais parâmetros da ação fotodinâmica contra *Candida albicans* e examinar se os mecanismos usados comumente pelos microrganismos para bloquear qualquer resposta oxidativa antimicrobiana ocorriam. Os biofilmes de *Candida albicans* foram sensíveis à fototoxicidade de uma maneira dose-dependente e alguns dos mecanismos usados por microrganismos para bloquear qualquer atividade oxidativa antimicrobiana não foram aparentemente operantes durante o tratamento fotodinâmico, mostrando que a APDT pode ser viável como terapia alternativa para tratamento de candidíases mucocutâneas ou cutâneas.

Jori et al. (2006) apontaram a APDT como possuidora de características favoráveis para o tratamento de infecções originadas de microrganismos patogênicos, por apresentar um largo espectro de ação, uma eficiente inativação de patógenos antibiótico-resistentes, a ausência de mutação não selecionando células microbianas foto-resistentes. A atividade citotóxica contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoário foi atribuída como sendo típica dos fotossensibilizantes que são carregados positivamente em valores de pH fisiológicos e caracterizados por uma hidrofobicidade moderada. Estes fotossensibilizantes em

uma concentração micromolar podem induzir uma diminuição nos registro da população microbiana após os períodos de incubação e irradiação subseqüentes. Portanto, a interação entre laser e fotossensibilizante pode representar uma modalidade alternativa eficaz no tratamento de infecções microbianas localizadas.

2.6.1 Ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Em uma pesquisa utilizando a bactéria *Saccharomyces cerevisiae* AD4, Ito (1980) tendo como posse o corante azul de toluidina e uma luz branca de xenônio avaliou o dano ocorrido na membrana celular através das medidas de fluxo de uma sonda molecular. Seus resultados sugeriram que a APDT possui a propriedade de provocar lise na membrana celular.

As diferenças estruturais existentes entre os diferentes tipos de bactérias devem ser levadas em consideração. No geral, bactérias Gram+ aeróbias desenvolvem a fotossensibilização através da formação do oxigênio singleto, já as anaeróbias não são sensibilizadas por este último, mas pela formação de outros radicais livres. No entanto, as bactérias Gram- devem ser tratadas com substâncias que promovam o rompimento de sua membrana (MALIK et al., 1990). Para ocorrer a inativação, o fotossensibilizante deve ser absorvido pela parede celular, unir-se a membrana interna da célula e ainda ocorrer a possível translocação deste para o citoplasma celular, ocasionando a inibição da síntese de DNA e posteriormente de RNA e proteínas.

A peroxidação lipídica fotodinâmica, que são os mecanismos fotodinâmicos em relação à membrana celular, foi alvo de estudo para Girotti (1990). Tal peroxidação se inicia com a absorção de fótons da luz por parte de um agente

fotossensibilizante culminando no desencadeamento das reações Tipo I e Tipo II faladas anteriormente.

Em um estudo realizado por Okamoto et al. (1992), foram testados os efeitos fotodinâmicos de fotossensibilizantes associados com o laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) em microrganismos cariogênicos, avaliando a zona de inibição de crescimento. Verificaram neste estudo zonas de inibição em todas as cepas de *Streptococcus mutans*, e quanto mais longo o período de irradiação, maior era a zona de inibição. Sugeriram então que, as bactérias cariogênicas podem ser mortas por irradiação com laser He-Ne, porém quando em presença de corantes específicos, como azul de metileno, Photofrin® e clorina e6.

Paardekooper et al. (1995) estudaram o efeito da APDT em complexos enzimáticos intracelulares utilizando o azul de toluidina. Os resultados mostraram que ocorria uma inibição desses complexos enzimáticos e também uma queda nos níveis de Adenosina Trifosfato (ATP). Portanto, as enzimas intracelulares são inativadas, inviabilizando assim a célula.

Para Wainwright (1998) \exists um microrganismo mostra seletividade para um corante como o azul de metileno, este pode ser passível de ser fotossensibilizado. No que se refere ao mecanismo de ação, dependendo de sua estrutura molecular e do meio onde está ocorrendo a transferência eletrônica, a molécula pode perder sua energia através do processo físico e passar para um estado tripleto excitado. A partir daí, os fotossensibilizantes podem ser submetidos a várias vias fotocitotóxicas e provocar diferentes eventos citotóxicos dependendo de sua localização (tabela1).

Tabela 1: Vias fotocitotóxicas nas células microbianas

Área de Ação	Ação	Resultado	Conseqüência	Evento citotóxico
Água	Abstração do hidrogênio peroxidação	Formação de radical hidroxila OH^\cdot	Formação de peróxido de hidrogênio, superóxido (O_2^\cdot)	Processos oxidativos adicionais
Parede/membrana celular, lipídeos e esteróis insaturados	Abstração do hidrogênio	Peroxidação Ligação cruzada peptídeos	Formação de hidroperóxido Inativação enzimática	Permeabilidade aumentada aos íons (perda de Na^+/K^+)
Peptídeos	Oxidação dos resíduos	Degradação Protéica		Perda da facilidade de reparo; Lise
Cobertura protéica viral	Reações de oxidação redução (REDOX)			Perda de infectividade viral
Cadeia respiratória	Oxidação ou ligações cruzadas			Inibição da respiração
Enzimas citoplasmáticas / enzimas virais (transcriptase reversa)				Inibição de conjunto ribossômico; inibição da replicação, infectividade
Resíduos de ácidos nucléicos (guanosina)	Oxidação da base ou do açúcar	8-hidroxi-guanosina	Degradação de nucleotídeos; degradação do açúcar / clivagem	Substituição da base; clivagem; partição; mutação; inibição da replicação

Fonte: Wainwright, (1998).

Em estudos fisiológicos espectroscópicos, Oldhan e Phillips (1999) demonstraram que não existe um único mecanismo responsável pela morte dos microrganismos. Para eles a fotoinativação, por exemplo, de Gram-positivas como o *Streptococcus mutans* necessitam apenas da produção de oxigênio singlete por serem aeróbias, no entanto, as bactérias Gram-negativas como a *Porphyromonas gingivalis* requerem a formação de outros radicais livres por serem anaeróbias.

Outro estudo, demonstrando o mecanismo de ação da APDT em colônias bacterianas, avaliou se este mecanismo poderia afetar fatores de virulência bacteriana como os lipopolissacarídeos (LPS) e proteases. Utilizando LPS de *Escherichia coli*, proteases de *Porphyromonas aeruginosas*, azul de toluidina e luz vermelha, a atividade dos fatores de virulência foram determinadas previamente e logo após a irradiação. Foi observado que a APDT pode ser um tratamento adicional para reduzir os fatores de virulência de agentes microbianos (KÖMERICK et al., 2006).

Bhatti et al. (2001) identificaram as proteínas fotossensíveis da membrana externa de *Porphyromonas gingivalis*. Para tal foi utilizado o laser de He-Ne (?= 632,8 nm) e o fotossensibilizante azul de toluidina nas concentrações de 0,5 e 5 µg/ml e foi criado um painel de anticorpos monoclonais para o patógeno em questão. Os anticorpos reconheceram várias proteínas fotossensíveis, sugerindo que tais proteínas são os principais alvos das espécies citotóxicas geradas durante a APDT e que tal terapia pode se tornar mais seletiva e assim potencialmente mais efetiva.

Kömerick e Wilson (2002) em um de seus estudos observaram que a composição e o pH do meio em que as bactérias estão suspensas influenciam na atividade da APDT mediada pelo azul de toluidina.

3. JUSTIFICATIVA

Visto que a APDT pode constituir um procedimento capaz de induzir morte bacteriana e desta forma combater a resistência antimicrobiana, propomos um estudo baseado em analisar a capacidade de dois agentes fotossensibilizadores em mediar a APDT, pois a eficiência deles em induzir morte bacteriana constitui um fator relevante na escolha de qual fotossensibilizante é mais eficaz em matar o microrganismo promotor de uma determinada infecção.

4. OBJETIVO GERAL

Comparar a eficácia do azul de metileno e da cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada como agentes fotossensibilizantes da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em induzir morte de bactérias Gram+.

4.1 Objetivos específicos

Analisar diferentes concentrações da cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada como agente fotossensibilizante da APDT em induzir morte de bactérias Gram+.

Comprovar a eficácia do azul de metileno como agente fotossensibilizante da APDT em induzir morte de bactérias Gram+.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Material

Meio de Infusão de cérebro e coração (BHI – “Brain Heart Infusion”) Difco, pH: 7,4: próprio para o cultivo *overnight* das culturas bacterianas. O meio foi obtido adicionando 37,0 g do pó a 1 L de água ultrapura seguida de autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Ágar Trípico de soja (TSA – “Tryptic Soy Agar”) Difco, pH: 7,3: ágar com digerido de soja e caseína utilizado para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. O meio foi obtido adicionando 40,0 g do pó do meio a 1 L de água ultrapura aquecendo com agitação freqüente até que o pó se dissolva completamente. Em seguida autoclavar a 121°C por 15 minutos.

“Mitis Salivarius Agar” (MAS): Difco, pH: 7,0: Meio seletivo para isolamento de *Streptococcus mutans*. O meio foi obtido adicionando 90,0 g do pó do meio a 1 L de água ultrapura aquecendo com agitação freqüente até que o pó se dissolva completamente. Em seguida autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Solução Tampão Fosfato de Sódio a 0,9% (PBS – “Phosphate Buffer Saline”) Fisher: solução contendo $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaCl , utilizado para obtenção das soluções estoque de fotossensibilizantes e suas respectivas diluições.

Cepas Bacterianas: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 1458) e *Enterococcus faecalis* (ATCC10100). Elas foram estocadas em meio BHI em tubo inclinado, repicados semanalmente e distribuídos em MAS (*Streptococcus mutans*) e TSA (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*).

Fotossensibilizantes: cloro-alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS₄) (Porphyrin Products, INC), nas concentrações de 10 µM, 20 µM, 30 µM e 40 µM obtidas através da diluição de solução estoque de AIPcS₄ 1 mM em Salina Tampão Fosfato (PBS); Azul de Metileno (AM) (Synth), na concentração de 5,34 µM (0,1 mg/ml).

Triton X-100: Sigma®. Solução contendo t-Octilfenoxipoli-etoxietanol utilizada para tratar a membrana externa das bactérias e assim facilitar a penetração do fotossensibilizante. Foi diluído em PBS para obtenção de uma concentração 1%.

Laser modelo Thera lase®: DMC Equipamentos Ltda - Brasil: diodo com meio ativo em Arsenieto de Gálio Alumínio (GaAlAs), com emissão na região do vermelho (λ = 630 - 690nm) com potência máxima de emissão de 50 mW e na região do infravermelho (λ = 810 - 830nm) com potência máxima de emissão de 500 mW , podendo ser contínuo ou pulsado.

Estufa de cultura modelo 502 A Orion®: utilizada para manutenção das colônias bacterianas num ambiente a 37°C.

Transiluminador UV de 302 nm (modelo T26M - BioAgency): utilizado para iluminar as placas e proceder com a contagem das UFC.

Fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System - Kodak®): utilizado para contar as UFC e documentar as imagens.

Espectrofotômetro SpectraCount modelo BS10001 (Packard BioScience Company) : utilizado para fazer a leitura da densidade óptica das culturas e determinar a curva de crescimento bacteriano.

5.2 Métodos.

5.2.1 Curva de crescimento

Uma unidade formadora de colônia (UFC) foi retirada da cultura estoque de cada cepa bacteriana mencionada (item 5.1) com auxílio da alça de platina e inoculada em 3 tubos contendo 20 ml de meio BHI respectivamente, com incubação a 37° C. A partir do momento da incubação, a cada 2 horas colhia-se 100 µl de cada tubo com o auxílio de um pipetador automático (Pipetman, Gilson® - França de 100 µl) e colocava em placa de 96 poços para a realização da leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 550 nm .

5.2.2 Inóculo bacteriano

Obtida a curva de crescimento bacteriano, uma UFC foi retirada da cultura estoque de cada espécie bacteriana mencionada com auxílio da alça de platina e inoculada no tubo contendo 20 ml de meio BHI e colocadas para incubar *overnight* a 37°C para que as bactérias atingissem o seu número máximo de crescimento.

5.2.3 Preparo das Placas de Petri

Em placas de Petri limpas e estéreis foram adicionados 20 ml de meio TSA próprio para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* ou 20 ml de meio MSA próprio para o desenvolvimento de *Streptococcus mutans*. Após distribuir os respectivos meios de cultura, as placas foram colocadas em estufa a 37°C para teste de esterilização (24 a 48 horas).

5.2.4 Método de Gram

Após o crescimento das culturas bacterianas em meio BHI, 20 µl de foram colocados sobre uma lâmina de vidro, espalhando a gota (esfregaço) e fixando com calor. Despejou-se o corante cristal violeta sobre a lâmina cobrindo todo o esfregaço deixando em repouso por um minuto. Enxaguou-se a lâmina para remover o excesso do corante e foi despejado lugol sobre a lâmina cobrindo todo o esfregaço deixando em repouso por um minuto; a lâmina foi novamente enxaguada para remoção do excesso do fixador. Com a lâmina inclinada, despejou-se algumas gotas de álcool-acetona 1:1 v:v (descolorizador) para remover o complexo cristal violeta-lugol das células Gram-. Este procedimento não pode exceder a cinco segundos. Em seguida, a lâmina foi enxaguada com água para remover o excesso do solvente. Despejou-se o corante fucsina básica (ou safranina) sobre a lâmina cobrindo todo o esfregaço deixando em repouso por um minuto. Enxaguou-se a lâmina com água pela última vez e elas foram secadas com papel absorvente.

5.2.5 Contagem e diluição da cultura bacteriana

Constatada ausência de contaminação da cultura bacteriana por bactérias Gram-, o processo de contagem bacteriana foi realizado. Para tal foi utilizada a Câmara de Neubauer (Bright - Line 0,0025 mm² ; Optik Labor), onde foi colocado 20 µl de cultura bacteriana para proceder com a contagem em microscópio (modelo DLMB; Leica).

Obtido o número de bactérias, as diluições foram realizadas em PBS (Solução Salina Tampão Fosfato a 0,9%) na proporção de 1:10, quantas vezes for necessário para chegar a um número de 10³ bact/ml, padronizando este valor experimentalmente.

5.2.6 Distribuição das alíquotas e adição do fotossensibilizante

Obtida a quantidade de bactérias desejada, alíquotas de 1000 µl foram distribuídas em tubos tipo eppendorfs de 1,5 ml e centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm e ressuspendidas em PBS. As amostras foram transferidas para placas de 24 poços e dispostas de maneira a caracterizar diferentes grupos (os grupos com seus respectivos constituintes estão assinalados a seguir) divididos em 3 fazes para que as bactérias não ficassem muito tempo suspensas em uma solução não nutritiva e viessem a morrer induzindo resultados falso-negativos:

Grupos da primeira fase:

- Grupo 1* (controle): cultura bacteriana;
- Grupo 2** : cultura bacteriana;
- Grupo 3* : cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + azul de metileno 5,34µM;

- Grupo 4^{**}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + azul de metileno 5,34µM.

Grupos da segunda fase:

- Grupo 5^{**}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 10 µM;
- Grupo 6^{**}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 20 µM;
- Grupo 7^{**}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 30 µM;
- Grupo 8^{**}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 40 µM.

Grupos da terceira fase:

- Grupo 9^{*}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 10 µM;
- Grupo 10^{*}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 20 µM;
- Grupo 11^{*}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 30 µM;
- Grupo 12^{*}: cultura bacteriana + Triton X 100 – 1% + AIPcS₄ 40 µM.

*Grupos que não foram irradiados.

**Grupos que receberam irradiação.

Os grupos foram distribuídos em triplicata e o processo experimental foi dividido em 3 fases como mencionado anteriormente: na primeira fase foram distribuídas alíquotas de 1000 µl de cultura bacteriana para o grupo controle (grupo 1), 1000 µl de cultura bacteriana para o grupo que será irradiado só com laser (grupo 2) e 500 µl de cultura bacteriana para os grupos onde seria adicionado 500 µl de azul de metileno (grupos 3 e 4). Nos poços onde seria colocado o fotossensibilizante, antes

foi adicionado 50 µl de Triton X 100– 1%. Ao final, a placa foi colocada em estufa a 37° C para incubar no escuro por um período de 1 hora para posterior irradiação.

Na segunda fase foram distribuídas alíquotas de 990 µl de cultura bacteriana para o grupo onde seria adicionado 10 µl de AIPcS₄ (grupo 5), 980 µl de cultura bacteriana para o grupo onde seria adicionado 20 µl de AIPcS₄ (grupo 6), 970 µl de cultura bacteriana para o grupo onde seria adicionado 30 µl de AIPcS₄ (grupo 7), 960 µl de cultura bacteriana para o grupo onde seria adicionado 40 µl de AIPcS₄ (grupo 8). Após adição do Triton X 100 - 1% e do fotossensibilizante preconizou-se o mesmo protocolo de incubação da fase 1.

Para a terceira fase seguiu-se o mesmo protocolo anterior de distribuição das alíquotas e adição do fotossensibilizante para os grupos 9, 10,11 e 12, mas com a diferença de que tais amostras não foram irradiadas.

5.2.7 Irradiação das amostras

Após uma hora de incubação a 37° C, as amostras foram transferidas para tubos tipo eppendorf e novamente centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos para retirar o fotossensibilizante não captado. Em seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o sedimento em 1000 µl de PBS e as amostras foram recolocadas na placa de 24 poços para realizar a irradiação com o laser diodo GaAIAs (DMC Equipamentos Ltda) nos parâmetros apontados no quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros de irradiação do laser Arsenieto de Gálio Alumínio (GaAIAs)

Comprimento de Onda	685 nm
Potência	30mW
Tempo de Irradiação	5.01 minutos

Área	2,0 cm ²
Densidade de Energia	4,5 J/cm ²
Distância entre a ponta da fibra óptica e a amostra	3 cm

5.2.8 Semeadura das amostras em Placas de Petri

Concluída a irradiação, foram retiradas alíquotas de 100 µl de cada poço e distribuídas uniformemente, com o auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri contendo 20 ml de meio sólido próprio para o desenvolvimento de cada cultura bacteriana. Ao final as placas de Petri foram vedadas com parafilme, e colocadas em estufa a 37° C por 24 horas para o desenvolvimento das UFC.

5.2.9 Método de leitura dos resultados

Transcorridas 24 horas, as placas de Petri foram colocadas sobre um transiluminador UV de 302 nm (T26M - BioAgency), registradas por fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging Sytem - Kodak®) e transferidas para um computador convencional para contagem das UFC através do programa Molecular Imaging Software (Kodak®). Na confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 2.0. Empregou-se o teste ANOVA com pós-teste Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Na obtenção da porcentagem de sobrevivência bacteriana, era calculada a média da triplicada de UFC de cada grupo.

5.2.10 Obtenção da concentração inibitória mínima da AIPcS₄

Após os procedimentos de cultivo, método de Gram, contagem, diluição e distribuição das alíquotas das culturas bacterianas assinaladas no item 5.1, foi adicionado a elas TritonX100 a 1% e AIPcS₄ nas concentrações de 1 µM, 5 µM e 10 µM, seguidas de incubação por uma hora a 37°C para captação do fotossensibilizante, irradiação nos parâmetros apontados no item 5.2.7, distribuição em placas de Petri e transcorridas as 24 horas de incubação a 37°C, foi preconizada a contagem das UFC e a concentração que determinou valores de UFC menores que o controle com significância estatística foi considerada como sendo a concentração inibitória mínima.

6. Resultados

Inicialmente obtivemos os valores da curva de crescimento das bactérias utilizadas neste estudo, e foi observado que cada bactéria apresenta um padrão de crescimento diferente, gráfico 1.

A cultura de *Enterococcus faecalis* foi a primeira a passar da fase lag para a fase exponencial, por volta da 4ª hora, chegando a fase estacionária na 8ª hora onde permaneceu até a 24ª hora. Já a cultura de *Staphylococcus aureus* passou para a fase exponencial por volta da 12ª hora estabilizando seu número na 18ª hora. A cultura de *Streptococcus mutans* foi a última a passar para a fase exponencial, por volta da 14ª hora, chegando a fase estacionária na 18ª hora como o *Staphylococcus aureus*. Estas duas últimas culturas também permaneceram na fase estacionária até a 24ª hora.

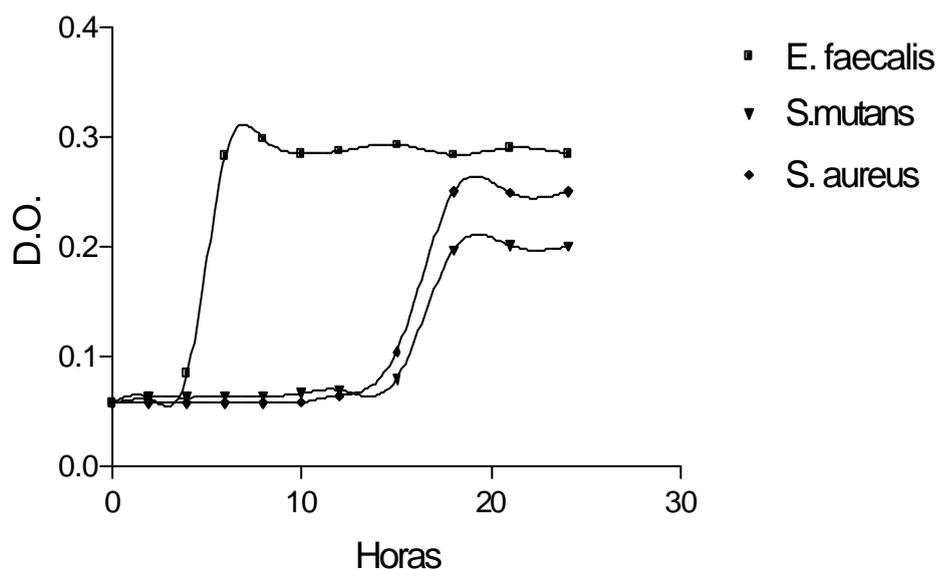


Gráfico 1- Curva de crescimento bacteriano.

A partir da obtenção da curva de crescimento bacteriano, foi padronizado o cultivo *overnight* a 37°C em 20 ml de meio BHI para as três bactérias estudadas e posteriormente elas foram submetidas ao método de Gram para a verificação da existência ou não de contaminação das culturas. A existência de contaminação foi constatada em 15% das culturas cultivadas, sendo imediatamente descartadas. Na ausência de contaminação, a contagem da quantidade de bactérias existentes por mililitro de meio foi realizada e a partir do número de bactérias obtido, foi preconizado diluições seriadas afim de diminuir a quantidade de bactérias para 10^3 bactérias por mililitro.

A leitura dos resultados foi baseada na quantidade de UFC que cada amostra podia desenvolver e elas expressavam as frações de sobrevivência bacteriana. Portanto foram obtidos valores UFC para os diferentes grupos propostos, depois de completadas 24 horas pós-experimento. Considerado que as UFC do grupo controle são 100%, os valores da porcentagem de sobrevivência bacteriana frente a diferentes situações foram indicados num processo comparativo com as do grupo controle.

Na análise da concentração inibitória mínima da AIPcS₄ foi observado que as culturas bacterianas submetidas à concentração de 10 µM da AIPcS₄ com posterior irradiação mostraram menores valores de UFC com significância estatística quando comparados ao controle, indicando indução de morte bacteriana. O mesmo não foi observado utilizando as outras concentrações mencionadas.

A primeira bactéria submetida ao protocolo de irradiação foi *Staphylococcus aureus* e, como descrito anteriormente, o procedimento foi dividido em 3 fases. Na primeira fase foi observado que (gráfico 2 e tabela 2) o valor médio obtido para o controle (grupo 1) foi de 1480 UFC (figura 2A, figura 3A e Figura 4A). As amostras

onde o laser foi utilizado isoladamente (grupo 2), foi observado um número médio de 1523 UFC (figura 2B) e a uma porcentagem de sobrevivência bacteriana superior ao do controle – 103%. Mas para amostras que continham azul de metileno foi observada uma grande variação de tais valores quando comparada ao controle, sendo contadas 799 UFC (figura 2C) em média com uma porcentagem de sobrevivência bacteriana de 54% para amostras que continham o fotossensibilizante na ausência de irradiação (grupo 3) e 646 UFC (figura 1D) em média com uma porcentagem de sobrevivência de 44% para amostras que continham tal fotossensibilizante, mas que também foram expostas ao laser (grupo 4).

Na segunda fase (gráfico 3 e tabela 2), as culturas expostas a 10 μM de AIPcS₄ e irradiadas (grupo 5) obtiveram um valor médio de 1369 UFC (figura 3B) com 92% de sobrevivência bacteriana quando comparada ao controle. A adição de 20 μM de AIPcS₄ com posterior irradiação (grupo 6) obteve um valor médio de 1114 UFC (figura 3C) com 75% de sobrevivência bacteriana. A incubação de bactérias com 30 μM de AIPcS₄ e submetidas a irradiação (grupo 7) chegou a um valor de 682 UFC (figura 3D) em média com um valor de sobrevivência de 46%. Com 40 μM de AIPcS₄ com posterior irradiação (grupo 8) promoveram a formação de 254 UFC (figura 3E) em média e 17% de sobrevivência bacteriana.

Na terceira fase, através da contagem das UFC das amostras que foram expostas a diferentes concentrações de AIPcS₄, mas sem exposição à irradiação laser, foi verificado que os valores de UFC e a porcentagem de sobrevivência bacteriana foram semelhantes ao controle (gráfico 4 e tabela 3). Observada a incapacidade das diferentes concentrações de AIPcS₄ em induzir morte bacteriana da na ausência de laser, preconizamos apenas o registro do valor médio da AIPcS₄ na concentração de 40 μM , juntamente com os dados da primeira fase.

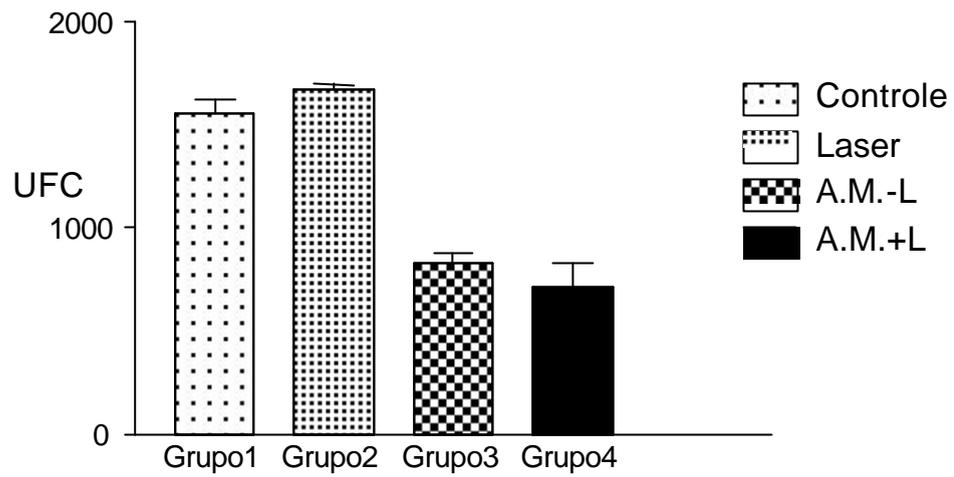


Gráfico 2- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito do laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 μM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 μM + laser (Grupo4) comparado ao controle (Grupo1) ($p < 0,05$).

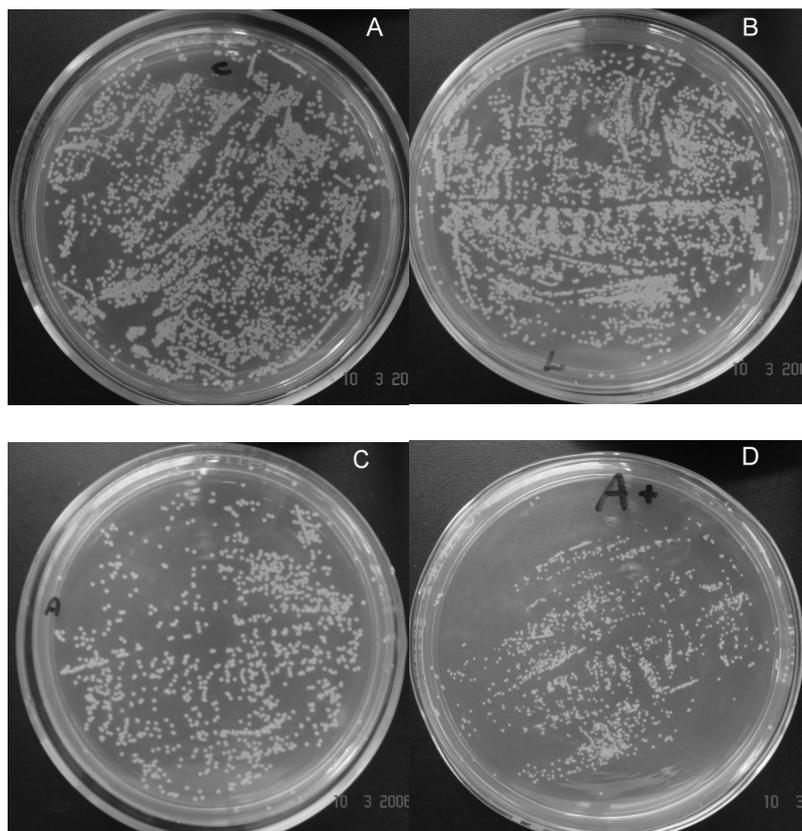


Figura 2: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – Laser isolado; C – Azul de Metileno 5,34 μM sem laser; D - Azul de Metileno 5,34 μM + laser.

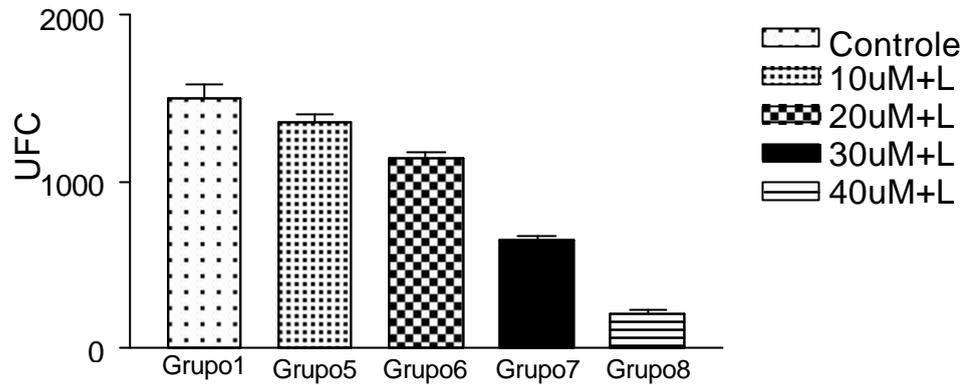


Gráfico 3- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: 10 µM de AIPcS4 (Grupo5), 20 µM de AIPcS4 (Grupo6), 30 µM de AIPcS4 (Grupo7), 40 µM de AIPcS4 (Grupo8) comparado ao controle (Grupo1) ($p < 0,05$).

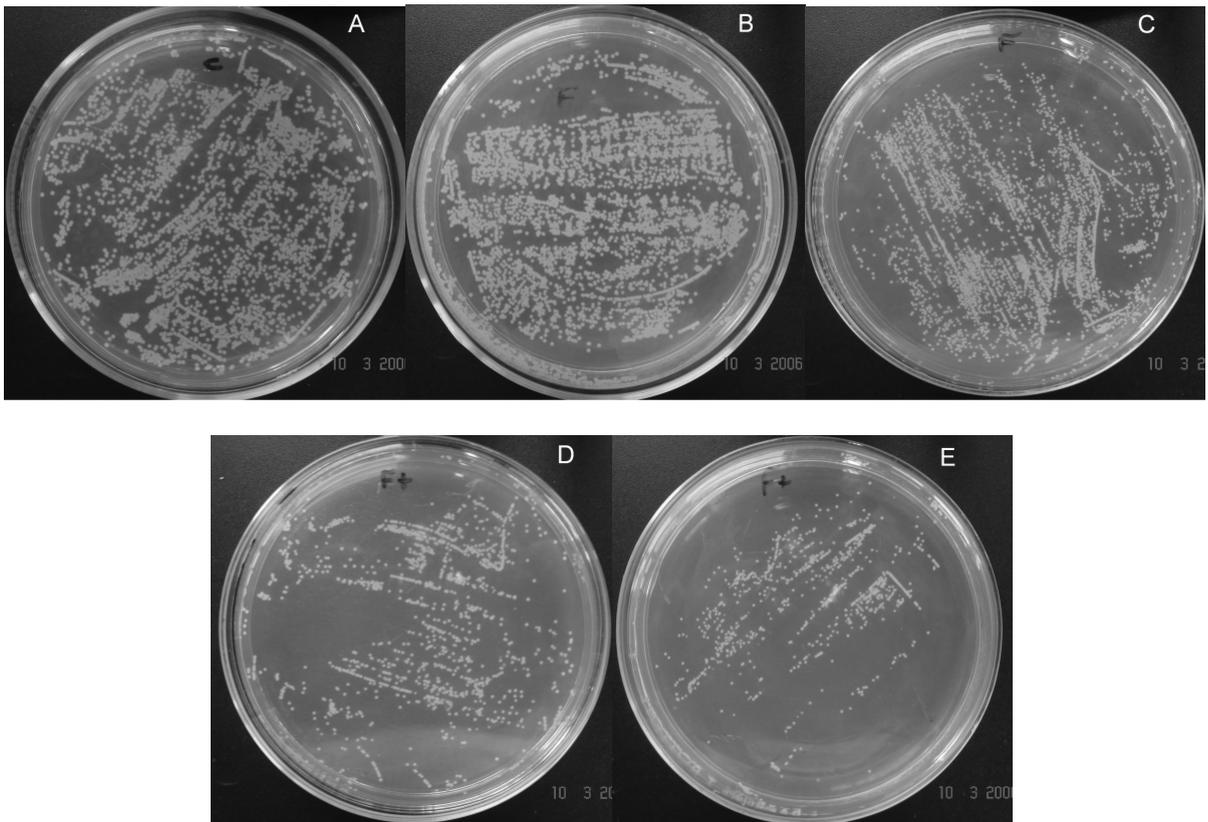


Figura 3: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 µM de AIPcS4; C- 20 µM de AIPcS4; D- 30 µM de AIPcS4; E- 40 µM de AIPcS4.

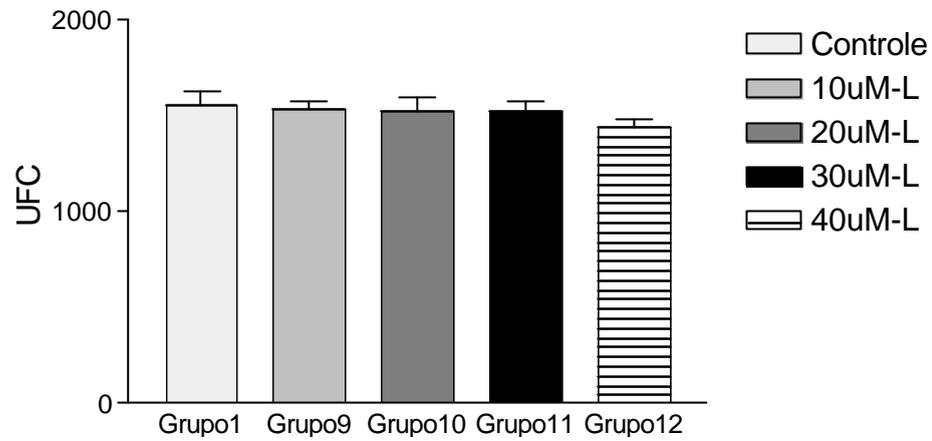


Gráfico 4- UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações da AIPcS₄ sem irradiação laser: 10 μM de AIPcS₄ (Grupo 9), 20 μM de AIPcS₄ (Grupo10), 30 μM de AIPcS₄ (Grupo11), 40 μM de AIPcS₄ (Grupo12) comparado ao controle (Grupo1) (p<0,05).

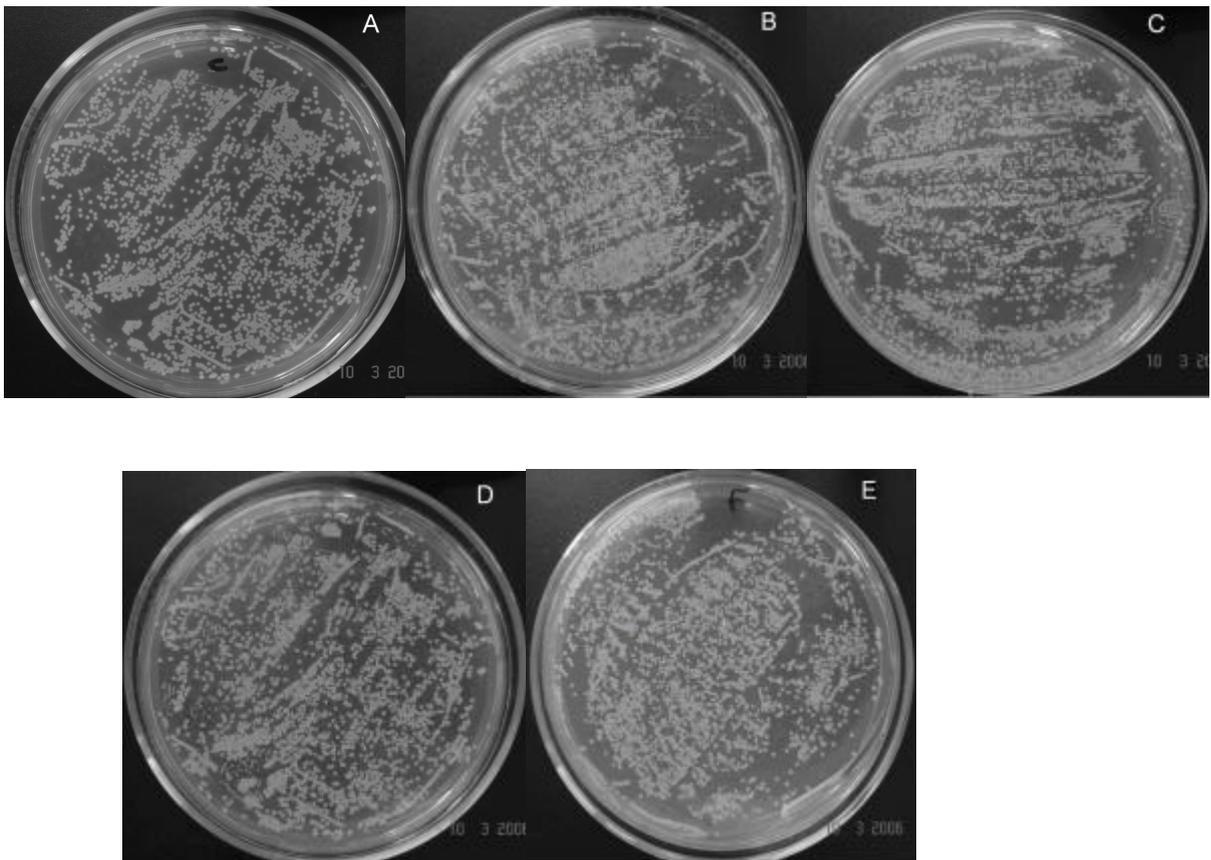


Figura 4: UFC de *Staphylococcus aureus* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS₄ sem posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS₄; C- 20 μM de AIPcS₄; D- 30 μM de AIPcS₄; E- 40 μM de AIPcS₄.

A cultura de *Enterococcus faecalis*, apresentou os seguintes valores: na primeira fase, gráfico 5 e tabela 2, podemos observar que o valor médio obtido para o controle (grupo 1) foi de 1592 UFC (figuras 5A e 6A). O laser usado isoladamente (grupo 2) possuiu um valor médio de 1579 UFC (figura 5C) e 99% de sobrevivência bacteriana, diferente dos resultados observados para amostras incubadas com azul de metileno na ausência de irradiação (grupo 3) que apresentavam 1225 UFC (figura 5D) e uma sobrevivência bacteriana de 77% e amostras incubadas com azul de metileno com posterior irradiação (grupo 4) que apresentavam 172 UFC (figura 5E) e uma sobrevivência bacteriana de 11%.

Na segunda fase, gráfico 6 e tabela 2, ao contar as UFC de amostras que continham diferentes concentrações de AIPcS₄ com posterior irradiação, foi observado valores de 486 UFC (figura 6B) com sobrevivência bacteriana de 30%, 469 UFC (figura 6C) com sobrevivência bacteriana de 29%, 393 UFC (figura 6D) com sobrevivência bacteriana de 25% e 257 UFC (figura 6E) com sobrevivência bacteriana de 16% para amostras incubadas com 10 µM de AIPcS₄ (grupo 5), 20 µM de AIPcS₄ (grupo 6), 30 µM de AIPcS₄ (grupo 7) e 40 µM de AIPcS₄ (grupo 8) respectivamente.

Na terceira fase, da mesma forma que o ocorrido para o *Staphylococcus aureus*, os valores de UFC e de sobrevivência bacteriana não sofreram variação significativa. Somente as amostras que continham 40 µM de AIPcS₄ na ausência de laser (grupo 12), que mostraram um valor médio de 1399 UFC (figura 5B) e 88% de sobrevivência bacteriana foram representadas juntamente com os valores obtidos na primeira fase, como visto no gráfico 5.

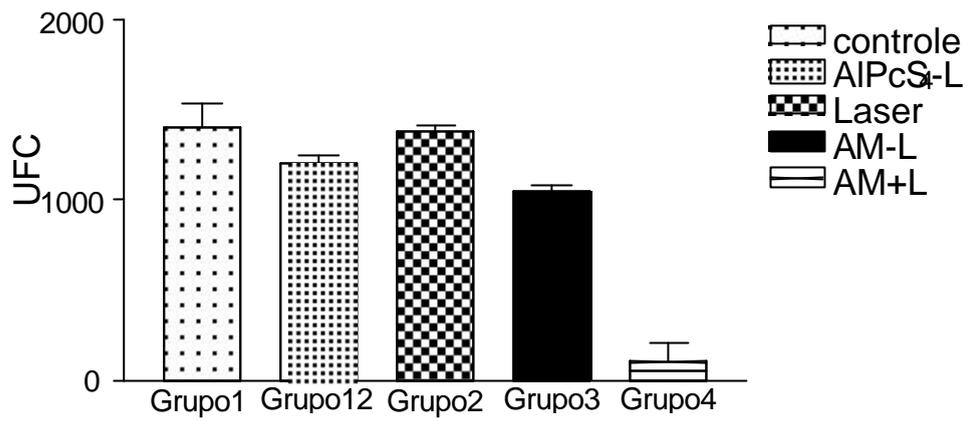


Gráfico 5- UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito da AIPcS₄ 40µM sem laser (Grupo12), laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 µM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 µM + laser (Grupo4) comparado ao controle (Grupo1). ($p < 0,05$).

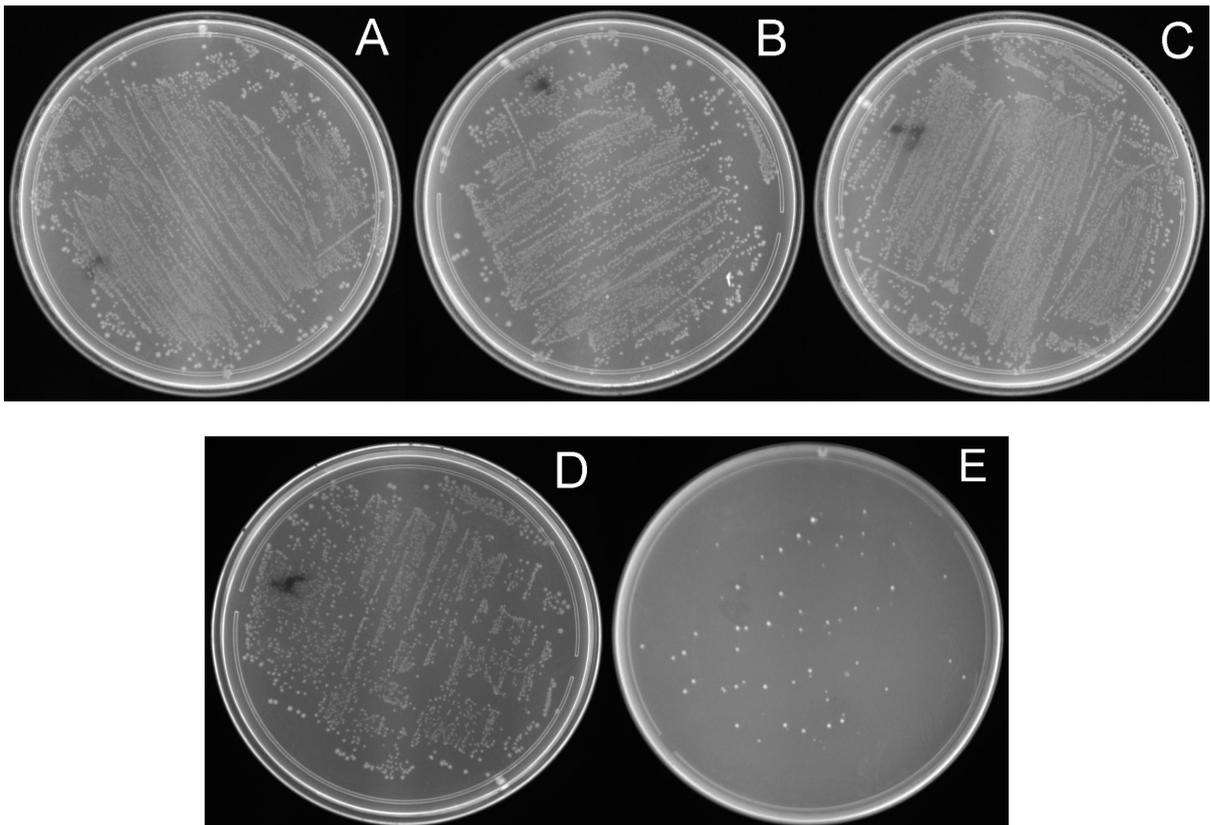


Figura 5: UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – AIPcS₄ 40 µM sem laser; C – Laser isolado; D – Azul de Metileno 5,34 µM sem laser; E - Azul de Metileno 5,34 µM + laser.

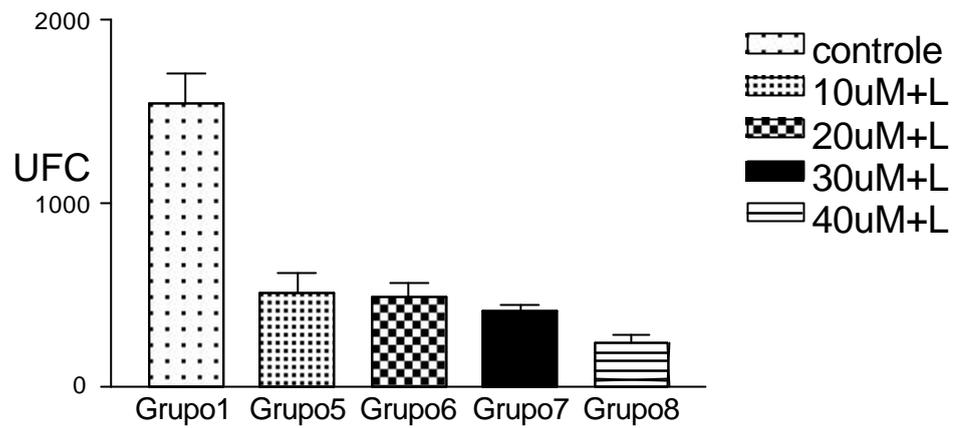


Gráfico 6- UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: 10 μ M de AIPcS4 (Grupo5), 20 μ M de AIPcS4 (Grupo6), 30 μ M de AIPcS4 (Grupo7), 40 μ M de AIPcS4 (Grupo8) comparado ao controle (Grupo1). ($p < 0,05$).

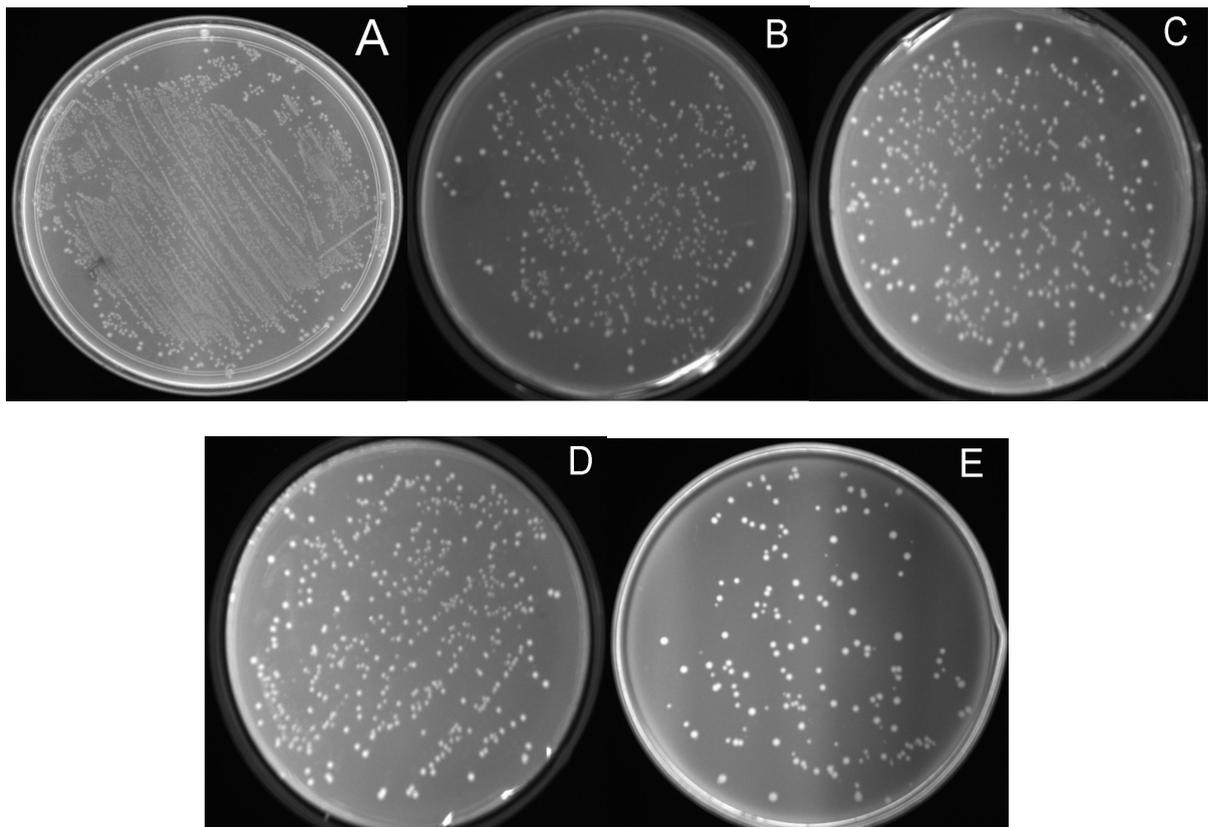


Figura 6: UFC de *Enterococcus faecalis* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μ M de AIPcS4; C- 20 μ M de AIPcS4; D- 30 μ M de AIPcS4; E- 40 μ M de AIPcS4.

O *Streptococcus mutans* foi a última bactéria submetida ao protocolo de irradiação e, na primeira fase, como observado no gráfico 7 e tabela 2, foi adquirido um valor médio de 1291 UFC (figuras 7A e 8A) para o controle (grupo 1). Amostras que receberam apenas a irradiação laser (grupo 2), apresentaram 1284 UFC (figura 7C) e uma porcentagem de sobrevivência bacteriana igual a do controle. Mas para amostras que continham azul de metileno observou-se uma variação, sendo contadas 1077 UFC (figura 7D) em média com sobrevivência bacteriana de 86% para amostras que continham o fotossensibilizante na ausência de irradiação (grupo 3) e 49 UFC (figura 7E) com porcentagem de sobrevivência de 4% para amostras que continham tal fotossensibilizante, mas que também foram irradiadas com laser (grupo 4).

Na segunda fase (gráfico 8 e tabela 2) foram registrados valores médios de 422 UFC (figura 8B) para amostras com 10 μM de AIPcS₄ submetidas à irradiação laser (grupo 5) com porcentagem de sobrevivência de 33%, 242 UFC (figura 8C) para amostras com 20 μM de AIPcS₄ submetidas à irradiação laser (grupo 6) com porcentagem de sobrevivência de 19%, 210 UFC (figura 8D) para amostras com 30 μM de AIPcS₄ submetidas à irradiação laser (grupo 7) com um porcentagem de sobrevivência de 16% e 42 UFC (figura 8E) para amostras com 40 μM de AIPcS₄ submetidas à irradiação laser (grupo 8) com um porcentagem de sobrevivência de 3%.

A terceira fase também não mostrou valores com diferenças significativas. As amostras que continham 40 μM de AIPcS₄ na ausência de irradiação (grupo 12), não apresentaram variação quando comparada ao controle, com um valor médio de 1315 UFC (figura 7B) e a mesma porcentagem de sobrevivência do controle sendo documentadas juntamente com os valores obtidos na primeira fase, gráfico 7.

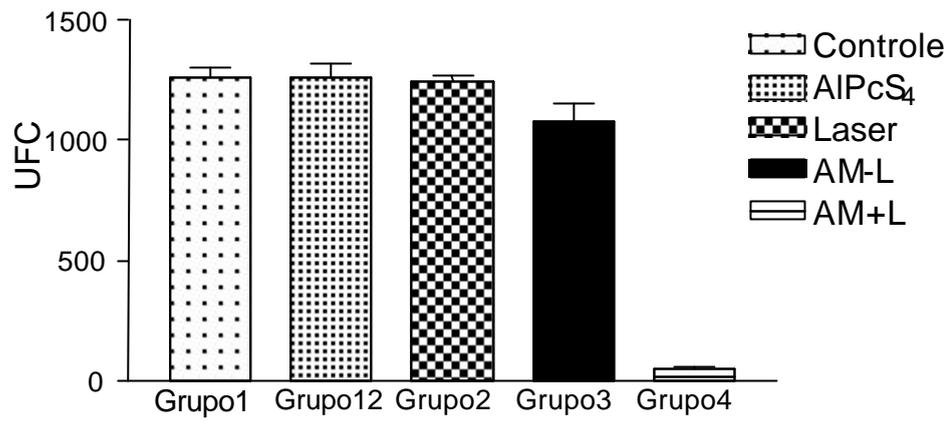


Gráfico 7- UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento onde se analisou o efeito da AIPcS₄ 40μM sem laser (Grupo12), laser isolado (Grupo2), Azul de Metileno 5,34 μM sem laser (Grupo3) e Azul de Metileno 5,34 μM + laser (Grupo4) de acordo com o controle (Grupo1). ($p < 0,05$)

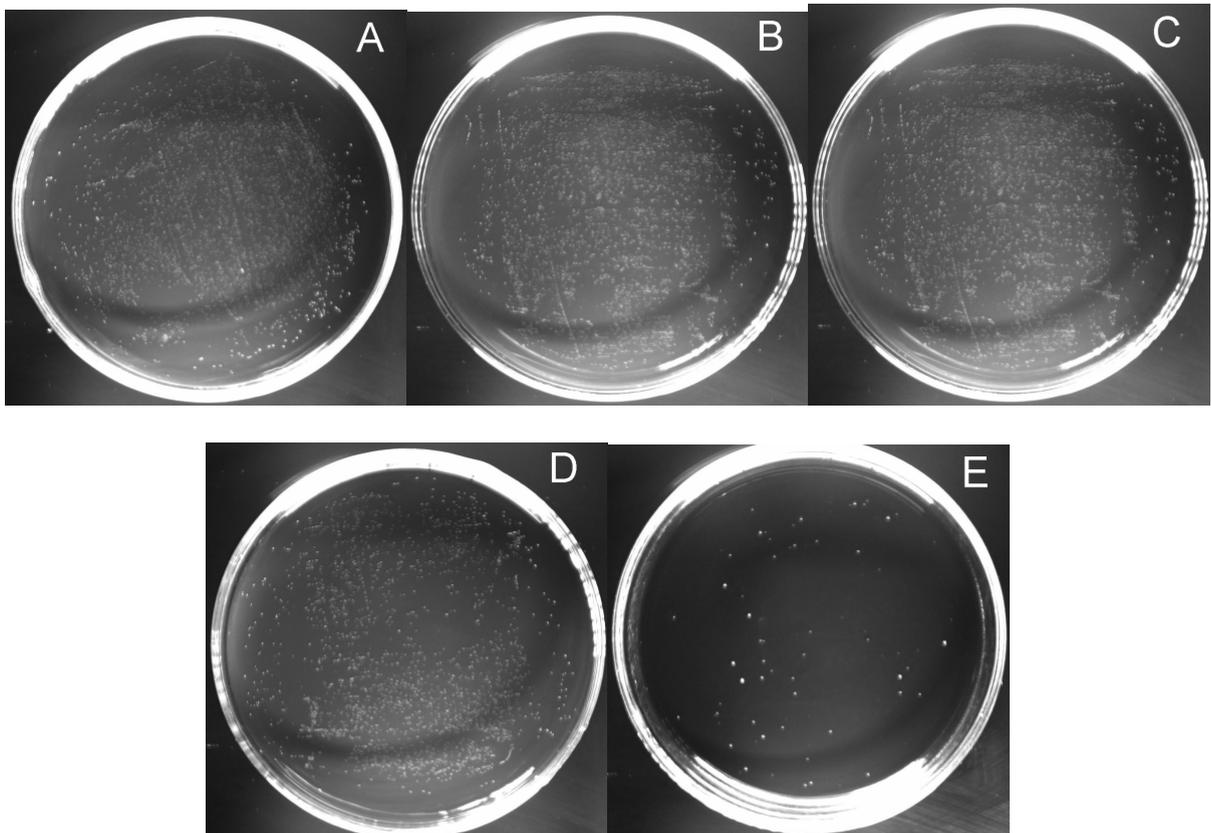


Figura 7: UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento: A – Controle; B – AIPcS₄ 40μM sem laser; C – Laser isolado; D – Azul de Metileno 5,34 μM sem laser; E - Azul de Metileno 5,34 μM + laser.

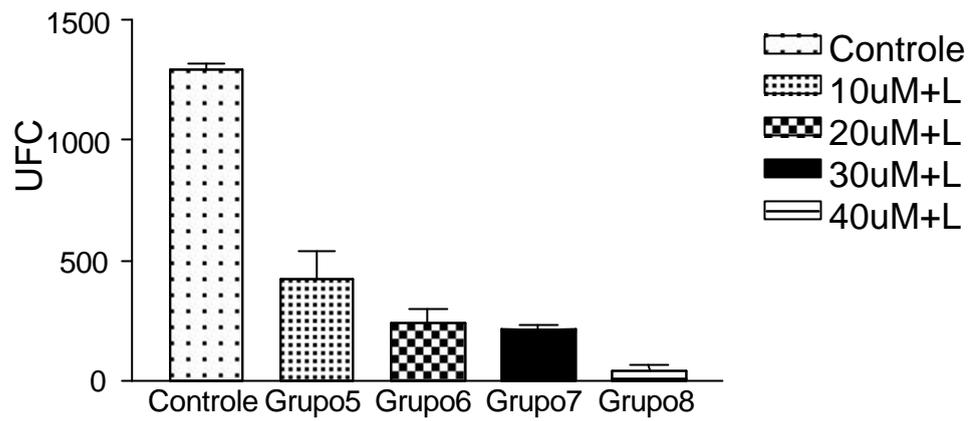


Gráfico 8: UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: 10 μM de AIPcS4 (Grupo5), 20 μM de AIPcS4 (Grupo6), 30 μM de AIPcS4 (Grupo7), 40 μM de AIPcS4 (Grupo8) de acordo com o controle (Grupo1). ($p < 0,05$).

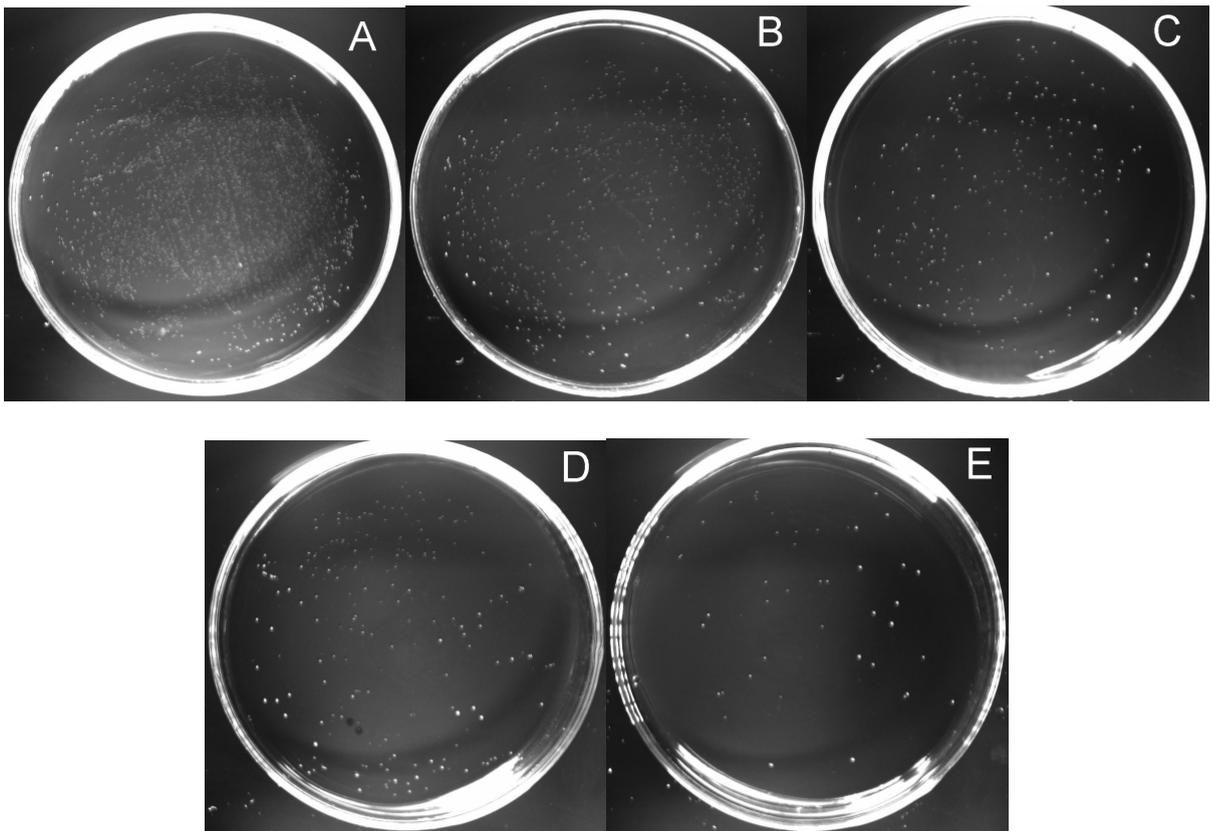


Figura 8: UFC de *Streptococcus mutans* 24 horas após o experimento com diferentes concentrações de AIPcS4 e posterior irradiação laser: A- Controle; B- 10 μM de AIPcS4; C- 20 μM de AIPcS4; D- 30 μM de AIPcS4; E- 40 μM de AIPcS4

Tabela 2: Susceptibilidade bacteriana frente a diferentes situações

Extrato Bacteriano	Grupo1 controle	Grupo2 só Laser	Grupo3 só AM 5,34µM	Grupo4 AM+Laser 5,34µM	Grupo5 AIPcS ₄ +Laser 10µM	Grupo6 AIPcS ₄ +Laser 20µM	Grupo7 AIPcS ₄ +Laser 30µM	Grupo8 AIPcS ₄ +Laser 40µM	Grupo12 só AIPcS ₄ 40µM
<i>Staphylococcus aureus</i>	1480±112 ^a	1523±67 (103%) ^b	799±94* (54%)	646±142* [€] (44%)	1369±97* [#] (92%)	1114±89* ^{#a} (75%)	682±64* ^{#a£} (46%)	254±31* ^{#a£¥} (17%)	1413±81 [€] (96%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1592±184	1579±81 (99%)	1225±44* (77%)	172±168* [€] (11%)	486±177* [#] (30%)	469±153* [#] (29%)	393±48* [#] (25%)	257±61* ^{a£¥} (16%)	1399±38* [€] (88%)
<i>Streptococcus mutans</i>	1291±32	1284±69 (100%)	1077±116* (86%)	49±11* [€] (4%)	422±169* [#] (33%)	242±73* ^{#a} (19%)	210±29* ^{#a} (16%)	42±34* ^{a£¥} (3%)	1315±87 [€] (102%)

^a Média das UFC ± Erro Padrão

^b Porcentagem de sobrevivência bacteriana

* Comparação ao grupo1

€ Comparação ao grupo3

Comparação ao grupo4

^a Comparação ao grupo5

£ Comparação ao grupo6

¥ Comparação ao grupo7

A presença do símbolo indica significância estatística ao grupo correspondente ($p < 0,05$)

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram uma significativa diferença na sobrevivência bacteriana diante das diferentes situações às quais as bactérias foram submetidas. De acordo com Wilson et al. (1992) e Millson et al. (1996), o azul de metileno com posterior irradiação não é efetivo contra bactérias até que uma certa concentração inicial eficaz tenha sido determinada e isso também vale para a AIPcS₄. A concentração do azul de metileno de 5,34 μM utilizada foi determinada através de uma revisão bibliográfica e tivemos como base os trabalhos de Chan e Lai (2003). Mas não foi encontrado na literatura nenhum registro sobre uma concentração eficaz da AIPcS₄ como agente fotossensibilizante no combate a microrganismos. Daí a necessidade da obtenção da sua concentração inibitória mínima. A partir da concentração inibitória mínima da AIPcS₄ (10 μM) em induzir morte bacteriana, diferentes concentrações foram analisadas até que se chegasse a uma concentração que promoveria semelhantes ou melhores resultados em comparação com o azul de metileno .

Estudos anteriores nos revelaram uma grande escala de corantes que podem ser usados como agente fotossensibilizante: ftalocianinas, porfirinas, azul de metileno, azul de toluidina, dentre outros (BERTOLONI et al., 2000; GRIFFITHS et al., 1997; WAINWRIGHT et al., 1998), e todos mostraram ter atividade contra bactérias Gram+ e Gram- frente à irradiação (MINNOCK et al., 1996). Esta eficácia de morte bacteriana promovida por todos estes fotossensibilizantes tem sido confirmada como sendo significativamente diferente entre bactérias Gram+ e Gram-, com maior eficácia contra as Gram+ (MALIK et al., 1992; NITZAN et al., 2001).

Foi observado que o azul de metileno por si só possuiu efeito bactericida para todas as bactérias utilizadas neste estudo, sendo tal efeito mais pronunciado nas amostras de *Staphylococcus aureus*, reduzindo aproximadamente 50% a sobrevivência bacteriana quando comparada às amostras controle. Isto foge uma regra fundamental do fotossensibilizante ideal que ressalta a importância da propriedade atóxica que eles devem possuir na ausência de irradiação. Já a AIPcS₄ na concentração de 40 µM na ausência de laser, promoveu uma pequena redução no número de UFC do *Enterococcus faecalis* em comparação com o controle, mas ela se mostrou atóxica na maioria das amostras das diferentes concentrações utilizadas. O laser, na ausência de qualquer fotossensibilizante, não promoveu nenhuma variação no número de UFC das amostras de bactérias, portanto o laser de baixa potência por si só não foi capaz de fotoinativar os microrganismos utilizados.

Se o fotossensibilizante se mostra tóxico quando utilizado na ausência de irradiação, ele também pode ser tóxico para as células orgânicas como mostrado por Paulino et al. (2005). Utilizando culturas de *Streptococcus mutans* e de fibroblastos expostas a diferentes concentrações de “Rose Bengal” (0 a 50 µM) e posterior irradiação com uma fonte luminosa com comprimento de onda de 400 a 500 nm em diferentes períodos de tempo (de 0 a 40 segundos), foi avaliada a viabilidade celular. Observou-se que a fonte luminosa na ausência de fotossensibilizante não foi tóxica e que o “Rose Bengal” na ausência de irradiação foi tóxico na concentração acima de 2,5 µM para ambas as culturas celulares. As concentrações entre 0,5 e 2,5 µM foram eficazes em induzir morte de *Streptococcus mutans* sem provocar efeito citotóxico para os fibroblastos.

Apesar do efeito bactericida do azul de metileno observado neste estudo quando

utilizado na ausência de irradiação, sua toxicidade é reportada como sendo muito baixa. Ele tem sido usado em elevadas concentrações em vários diagnósticos e terapias, incluindo injeção intrarterial em cirurgias reconstrutivas (JONES et al., 1996), administração intravenosa (5mg/kg diluído em 500ml de solução glicosada) para tratamento de hiperparatireoidismo primário (ROBERT et al., 1998), em infusões contínuas para tratamento de choque séptico (BROWN et al., 1996), sendo a sua aplicação mais importante na PDT contra células neoplásicas (ORTH et al., 1995).

O azul de metileno e alguns de seus derivados (azul de metileno 1,9-dimetil e azul de metileno 1-metil) mostraram toxicidade e fototoxicidade contra *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina (WAINWRIGHT et al., 1999). Cada um dos fotossensibilizantes utilizados isoladamente induziu morte bacteriana. O mesmo resultado, só que em maior escala, também foi observado quando eles foram irradiados com uma fonte luminosa de 6,3 J/cm². Mas o azul de metileno induziu um menor número de mortes quando em comparação com os seus derivados. Isto pode ser explicado pela maior hidrofobicidade que os derivados do azul de metileno obtiveram a partir da alteração estrutural às quais ele foi submetido, permitindo uma maior permeabilidade da parede celular das bactérias a esses fotossensibilizantes.

A concentração inibitória mínima da AIPcS₄ (10µM) com posterior irradiação laser possuiu efeito bactericida estatisticamente significativo em todas as culturas bacterianas, sendo bastante expressivo para *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. As demais concentrações (20µM, 30µM, 40µM) seguidas de irradiação laser promoveram reduções ainda maiores do número de UFC, ou seja, quanto maior a concentração da AIPcS₄ empregada, menor a porcentagem de sobrevivência

bacteriana frente a irradiação. Através desses resultados foi observado que o grau de indução de morte bacteriana é diretamente proporcional à concentração do fotossensibilizante.

Sabe-se que as bactérias Gram- possuem certa resistência contra APDT devido elas não serem susceptíveis a ação de muitos fotossensibilizantes, mas estes conduzem prontamente à fototoxicidade nas bactérias Gram-positivas, ou seja, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a APDT em comparação às espécies Gram-negativas. Alguns fatores, como carga catiônica do fotossensibilizante assim como o uso de agentes que aumentam a permeabilidade da membrana externa das bactérias, podem aumentar a eficácia da APDT em provocar morte de bactérias Gram-negativas e melhorar ainda mais sua eficácia contra Gram-positivas (HAMBLIN e HASAN, 2004; DEMIDOVA ; HAMBLIN 2004).

Existem evidências sugerindo que fotossensibilizantes que penetram no interior da bactéria pode ser mais efetivo que aquele que age na superfície bacteriana (HAMBLIN et al., 2002). Nós preconizamos o uso do Triton X-100 a 1% (SCHMIDT et al., 1998), uma substância que promove uma melhor permeabilidade da parede celular das bactérias aos agentes fotossensibilizantes. Mas isto não quer dizer que os agentes fotossensibilizantes que agem na superfície bacteriana não são eficazes, como muitos trabalhos anteriores já mostraram (BHATTI et al., 1998).

Em nosso estudo não foi possível analisar a diferença da eficácia da APDT entre bactérias Gram- e Gram+, pois foram utilizadas apenas integrantes deste último grupo bacteriano. Contudo foi observada uma variação na porcentagem de sobrevivência entre os integrantes deste mesmo grupo de bactérias. É sugerido que as diferenças bioquímicas existentes entre os microrganismos ou mesmo as diferentes respostas

produzidas por cada bactéria ao estresse oxidativo acarretam resultados variados na indução de morte de cada tipo bacteriano (DEMIDOVA ; HAMBLIN, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que a APDT contra *Staphylococcus aureus* pode possuir uma variação considerável devido ao fotossensibilizante usado e as respostas que eles induzem. E foi estabelecido que, para organismos Gram+, tanto fotossensibilizantes carregados positivamente como os carregados negativamente são efetivos para mediar a APDT por submeter tais organismos ao estresse oxidativo (MALIK et al., 1990; SOUKOS et al., 1998).

Alguns fotossensibilizantes possuem uma carga positiva inata, necessitando se ligar a um veículo molecular catiônico tal como o poli-L-lisina. Esta ligação confere ao fotossensibilizante capacidade de penetrar através da barreira de permeabilidade bacteriana (DEMIDOVA ; HAMBLIN, 2004).

Embora não existam estudos detalhados sobre a carga iônica total carregada pelo muco extracelular, existem trabalhos que mostram a interação hidrofóbica entre o muco bacteriano em promover adesão a superfícies e assim determinar patogenicidade bacteriana (DAS et al., 2001; SCHMIDt et al., 1998). Conseqüentemente, pode-se supor que as características do muco têm um significativo papel na determinação da ligação e penetração intracelular de fotossensibilizante que varia em carga e hidrofobicidade. Portanto uma maior ou menor morte bacteriana pode ser determinada pelas características de sua superfície quanto à penetração do agente fotossensibilizante e também pelas características hidrofóbicas do mesmo.

A diferença morfológica entre bactérias Gram+ e Gram- é que estas últimas possuem uma membrana externa (bicamada lipídica) fora da camada de peptídeoglicano (MALIK et al., 1992). A natureza complexa da membrana externa das

bactérias Gram- foi determinante para não a usarmos em nosso trabalho, pois a penetração de agentes fotossensibilizantes é dificultada. Para uma melhor ação dos fotossensibilizantes em Gam- é necessário utilizar substâncias que promovam o rompimento de sua membrana externa (MALIK et al., 1990).

A toxicidade de alguns tipos de fotossensibilizantes foi mensurada diante de diferentes bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*). Para tal, diferentes doses de energia durante a iluminação foram usadas, e em diversos casos a dosagem de 6,3 J/cm² resultou em diminuições consideráveis nas concentração inibitória mínima das substâncias (WAINWRIGHT et al., 1997). Contudo, no presente estudo foi utilizado um parâmetro fixo do laser. Estudos baseados em diferentes parâmetros do laser nas culturas bacterianas utilizadas são válidos, pois diminuições na concentração letal mínima da AIPcS₄ e na toxicidade do azul de metileno pela utilização de outras concentrações podem ocorrer.

Lambrechts et al. (2005) analisaram o efeito do plasma sanguíneo humano e da albumina sérica humana (HSA) na APDT contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans*. Utilizando luz branca (30 mW/cm²) e o cátion 5 phenyl-10,15,20-tris (N-methyl-4-pyridyl) de cloreto de porfirina (TriP[4]) como fotossensibilizante, eles observaram que os microrganismos foram fotoativados com sucesso quando suspenso em PBS. Ao mudar o meio de PBS para plasma sanguíneo humano o efeito da APDT contra todos os três microrganismos foi reduzido drasticamente. Tais resultados se repetiram quando da utilização de suspensões de 4.5% e de 7% HSA/PBS, mostrando que a albumina inibe a APDT contra *Streptococcus aureus*, *Porphyromonas aeruginosa* e *Candida albicans* de uma maneira dose dependente. Portanto a utilização do PBS como meio para promover a irradiação em

experimentos *in vitro* é de suma importância para a visualização da real eficiência da APDT em induzir morte de microrganismos e assim evitando a obtenção de resultados falso-positivos.

Todas as evidências disponíveis sugerem que as amostras de bactérias resistentes a antibióticos são facilmente combatidas pela APDT assim como amostras não resistentes, e que as bactérias não desenvolvem prontamente a resistência a APDT. Isso é possível graças a ausência de atividade mutagênica, alta seletividade do fotossensibilizante para microrganismos sobre células do hospedeiro, uma ótima e homogênea distribuição do fotossensibilizante na área infectada e a habilidade em irradiar eficazmente a lesão (HAMBLIN ; HASAN, 2004; DEMIDOVA ; HAMBLIN, 2004).

As proteínas que expressam resistência a antibióticos (MDR) estão localizadas na membrana e bombeiam tais drogas para fora das bactérias. Estudos realizados com amostras desprovidas de MDR mostraram mais morte celular do que a observada com amostras do tipo selvagem quando da utilização de 3 tipos de corantes fenotiazínicos e luz vermelha. Portanto, foi proposto que os inibidores específicos de MDR poderiam ser usados em combinação com sais fenotiazínicos para realçar sua eficiência fotodestrutiva frente a irradiação laser (TEGOS ; HAMBLIN, 2006).

As infecções de boca são, na maioria das vezes, localizadas e se não forem tratadas podem conduzir a condições potencialmente ameaçadoras. Patologias orais como cárie, pulpites, doenças periodontais e infecções da mucosa oral que se mostram ulceradas são prontamente acessíveis e susceptíveis a APDT. Estudos apontam a susceptibilidade de muitos microrganismos orais causadores de infecções a APDT em grau variado, e que os fotossensibilizantes têm sido efetivos sem causar danos aos tecidos adjacentes. O uso de fotossensibilizadores apropriados e de luz laser em

comprimentos de ondas efetivos podem diminuir a quantidade de quase todos os organismos numa determinada região, mas na cavidade oral onde há uma balanceada microflora nativa, a APDT pode potencialmente ser um problema, pois pode conduzir a um crescimento de organismos oportunistas (KOMERICK ; MACROBERT, 2006).

O número e a massa bacteriana são fatores importantes para a eficácia da APDT, pois eles são determinantes na ligação ao fotossensibilizante disponível e às espécies de oxigênio reativo gerados extracelularmente (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005). Através da comparação de valores de sobrevivência dos microrganismos estudados após adição de um dos três fotossensibilizantes utilizados (*Rose Bengal* - RB, azul de toluidina - TBO e um conjugado de clorina poly-L-lisina – pL-ce6) seguida de iluminação com comprimentos de onda apropriados, foi observada uma variação nos resultados quando da diluição das amostras em PBS antes e após a adição do fotossensibilizante. O pL-ce6 foi o fotossensibilizante mais eficaz, sendo igualmente eficaz com e sem diluição, e mostrou uma dependência forte na concentração celular. O TBO foi menos efetivo em todas as amostras, e a dependência na concentração das células foi menos pronunciada. O RB se mostrou ineficaz após a diluição (exceto para *S. mutans*), mas mostrou uma certa dependência da concentração celular. Contudo as diluições das culturas bacterianas se fizeram necessárias no atual estudo para evitar a formação de “tapete” durante seu crescimento em Placas de Petri, e isso não foi determinante para que a AIPcS4 e o azul de metileno mostrassem alguma ineficiência.

Ao compararmos os efeitos da AIPcS4 40 µM com o azul de metileno 5,34 µM podemos observar a grande diferença existente quanto a concentração, mas isso não determinou que a maior concentração da primeira fosse tão mais eficaz que o segundo.

Pôde-se notar uma considerável diferença da eficiência entre os dois fotossensibilizantes apenas nas amostras de *Staphylococcus aureus*, sendo bem equilibrada a eficiência deles contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Mas vale ressaltar que apesar da grande diferença de concentração entre os fotossensibilizantes, o de menor concentração, azul de metileno, foi relativamente tóxico quando utilizado sem irradiação para os três microrganismos estudados. Apesar da maior concentração da AIPcS₄, sua quantidade volumétrica utilizada foi menor quando comparada ao volume do azul de metileno empregado.

Uma notável característica dos fotossensibilizantes em provocar morte celular é a sua capacidade de formar dímeros ou agregados que são as principais espécies que participam da foto-oxidação. Foi demonstrado por Bartlett e Indig (1999), a relação entre dímeros de fotossensibilizantes (incluindo os dímeros de azul de metileno) e proteínas na fotossensibilização e sua contribuição nas reações do tipo I e tipo II para a total fotossensibilização. Conseqüentemente, as diferenças da excitação energética e da estrutura geométrica monomérica e dimérica dos fotossensibilizantes devem ser consideradas na avaliação da eficácia em promover a fotossensibilização.

Usacheva et al. (2003) demonstraram espectrofotometricamente a ocorrência de uma reação metacromática entre fotossensibilizantes fenotiazínicos, azul de metileno e azul de toluidina, em bactérias. Além disso, as bactérias induziram uma adicional dimerização dos fotossensibilizantes. Foi observada uma relação entre a habilidade de cada fotossensibilizante em formar dímeros e sua eficácia em induzir morte, fornecendo uma evidência que confirma o papel essencial dos dímeros provenientes dos fotossensibilizantes na APDT.

Os experimentos mostraram que a APDT tem boa funcionalidade como

alternativa para uma terapia antibiótica tópica. Apesar desses resultados experimentais promissores, somente uma experimentação controlada e minuciosa em animais pode provar a eficácia da APDT para inativação de bactérias *in vivo*.

Indicadores para AlPcS₄ mostram que ela teria uma boa eficácia para controlar a colonização bacteriana. Seria válido testá-la em animais, para esterilizar feridas, desinfetar a pele e lesões da mesma, realizando estudos da eficácia antimicrobiana contra bactérias *in vivo* em comparação com sua eficácia contra bactérias *in vitro*. Já para o azul de metileno são necessárias novas pesquisas para se chegar a uma concentração que seja menos tóxica, pois na ausência de laser ele induziu morte bacteriana, e isso poderia também provocar sérios danos às células orgânicas.

Porém, faz-se necessário a realização de análises para elucidar melhor os caminhos do processo de morte celular, haja visto que a qualquer momento a APDT pode ser testada *in vivo*, sem o real conhecimento do impacto intracelular que ela propõe.

8. CONCLUSÃO

Num processo comparativo entre a AIPcS₄ e o azul de metileno foi observado que ambos são úteis em induzir morte de bactérias Gram+ sendo, portanto, eficazes como agentes fotossensibilizantes da APDT, e que a maior concentração da AIPcS₄ produziu valores similares ao do azul de metileno na indução de morte bacteriana. Mas sugerimos que a AIPcS₄ é mais útil para ser usada na APDT por não apresentar toxicidade na ausência de laser e pelo seu menor volume utilizado.

Foi constatado que a porcentagem de sobrevivência bacteriana é menor quanto maior foi a concentração da AIPcS₄, mostrando que o grau de morte das bactérias Gram+ foi concentração-dependente.

Já para o azul de metileno foi também observado seu grande potencial em induzir morte bacteriana, comprovando assim sua eficiência na APDT contra bactérias Gram+.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.H.; CHILDS, C.J.; SIBATA, C.H. Photosensitizes in clinical PDT. **Photodiag Photodynam Ther**, v. 1, p. 27-42, 2004.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. f. 131. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.

APEL, C.; BIRKER, L.; MEISTER, J.; WEISS, C.; GUTKNECHT, N. The caries-preventive potential of subablative Er: YAG and Er: YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 4, p. 312-7, 2004.

BAAS, P.; VAN MANSOM, I.; VAN TINTEREN, H.; STEWART, F.A.; VAN ZANDWIJK, N. Effect of N-acetylcysteine on Photofrin-induced skin photosensitivity in patients. **Lasers Surg Med**, v. 16, p. 359-67, 1995.

BARTLETT, J.A.; INDIG, G.L. Effect of self-association and protein binding on the photochemical reactivity of triarylmethans. Implication of no covalent interactions on the competition between photosensitization mechanisms Type I and Type II. **Photochem Photobiol**, v. 70, p. 490-98, 1999.

BERTOLONI, G.; LAURO, F.M.; CORTELLA, G.; MERCHAT, M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, p. 169-74, 2000.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol**, v. 68, p. 370-6, 1998.

BHATTI, M.; SEAN, P.N.; MAC ROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; SHEPHERD, P. Identification of Photolabile outer proteins of *Porphyromonas gingivalis*. **Curr Microbiol**, v. 43, p. 96-9, 2001.

BILSKI, P.; MOTTEN, A.G.; BILSKA, M.; CHIGNELL, C.F. The fotooxidation of diethylhydroxylamine by rose bengal in micellar and nonmicellar aqueous solutions. **Photochem Photobiol**, v. 58, p. 11-8, 1993.

BOYLE, R.K.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem Photobiol.**, v. 64, p. 469-85, 1996.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med Sci.**, v. 17, p. 173-86, 2002.

BROWN, G.; FRANKL, D.; PHANG, T. Continuous infusion of methylene azul for septic shock. **Postgrad Med J.**, v. 72, p. 612-24, 1996.

BRUGNERA, Jr. A.; PINHEIRO, A.L.B. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast; 1998.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag Photodynam Ther.**, v. 1, p. 279-93, 2004.

CHABRIER-ROSELLO, Y.; FOSTER, T.H.; PEREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C.G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4288-95, 2005.

CHAN, Y.; LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v.18, p. 51-5, 2003.

DAS, S.C.; KAPOOR, K.N.; MUKHOPADHYAY, M. Comparative evaluation of hydrophobicity measures for virulence determination of *Staphylococcus epidermidis* from hospitalized patients and healthy individuals. **Indian. J. Med. Res.**, v. 114, p. 160-163, 2001.

DAVEY, M.E.; O' TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 64, p. 847- 67, 2000.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2329-35, 2005.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J**

Immunopathol Pharmacol, v. 17, n. 3, p. 245-54, 2004.

DETTY, M.R.; GIBSON, S.L.; WAGNER, S.J. Current clinical and pre-clinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **J Med Cham.**, v. 47, p. 3897-3915, 2004.

FINGAR, V.H.; WIEMAN, T.J.; KARAVOLOS, P.S.; DOAK, K.W.; OUELLET, R.; VAN LIER, J.E. Ther effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakAge and tumor response. **Photochem Photobiol.**, v. 58, p. 251-8, 1993.

FUNKE, B.R.; TORTUGA, G.J.; CASE, C. **Microbiologia**, São Paulo: Artmed 8ª Edição, 2005.

GAD, F.; ZAHRA, T.; FRANCIS KP.; HASAN, T.; HAMBLIN, M.R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, n. 5, p. 451-8, 2004.

GIROTTI, A.W. Photobiology school. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. **Photochem Photobiol**, v. 51, n. 4, p. 497-509, 1990.

GRIFFITHS, M.A.; WREN, B.W.; WILSON, M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro* using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. **Antimicrob Chemother J.**, v. 40, p. 873–876, 1997.

GRUNE, T.; KLOTZ, L.O.; GIECHE, J.; RUDECK, M.; SIES, H. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite. **Free Radic Biol Med.**, v. 30, p. 1243-1253, 2001.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic Therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci.**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, M.R.; O'DONNELL, D.A.; MURTHY, N.; CONTAG, C.H.; HASAN, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. **Photochem Photobiol.**, v. 75, p. 51-57, 2002.

HAMBLIN, M.R.; O'DONNELL, D.A.; MURTHY, N.; RAJAGOPALAN, K.; MICHAUD, N.; SHERWOOD, M.E.; HASAN, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain

length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 941-951, 2002.

HAN, G.Y.; PARK S-H; YOON, T.C. Antimicrobial activity of calcium hydroxide containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. **J Endod.**, v. 27, p. 328-332, 2001.

HART, C.A.; KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in developing countries. **Br Med J.**, v. 317, p. 647-650, 1998.

ITO, T. The dependence of photosensitizing efficacy of acridine orange and toluidine blue on the degree of sensitizer-cell interaction. **Photochem Photobiol**, v. 31, n. 6, p. 565-570, 1980.

JEVONS, M. 'Celbenin' - resistant staphylococci. **Br Med J**, v. 1, p. 124-125, 1991.

JONES, N.F.; MONSTREY, S.; GAMBIER, B.A. Reability of the fibular osteocutaneous flap for mandibular reconstruction: anatomical and surgical confirmation. **Plast Reconstr Surg.**, v. 97, p. 707-716, 1996.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med.**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

KESSEL, D.; LUO, Y.; DENG, Y.; CHANG, C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.**, v. 65, p. 422-6, 1997.

KHADRA, M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. **Swed Dent J Suppl.**, v. 172, p. 1-63, 2005.

KIMURA, Y.; YONAGA, K.; MURAKOSHI, M.; YOKOYAMA, K.; WATANABE, H.; MATSUMOTO, K. Effects on periradicular periodontal tissues of root canal irradiation with Er:YAG laser in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 4, p. 335-41, 2004 .

KOMERIK, N.; MACROBERT, A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**, v. 25, n. 1-2, p. 487-504, 2006.

KÖMERICK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O- mediated lethal photosensitization. **J Appl Microbiol.**, v. 92, p. 618-623, 2002.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT B. Effect of low-level GaAsAl laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 4, p. 353-358, 2003.

KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; MARCASSA, L.G.; ZÍLIO, C.S.; BAGNATO, V.S.; CESTARI, G.A.; JAVARONI, A.; BERTO, J.C.; PASSERI, C.; BANILHA, V.S.; SILVA, M.; FERREIRA, J.; VERÍSSIMO, F.M.; SOUZA, C.S. Implantação clínica da terapia fotodinâmica no Brasil: breve histórico e resultados avançados. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n. 20, p. 33-41, 2002.

LAMBRECHTS, S.A.; AALDERS, M.C.; VERBRAAK, F.D.; LAGERBERG, J.W.; DANKERT, J.B.; SCHUITMAKER, J.J. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. **J Photochem Photobiol B**, v. 79, n. 1, p. 51-57, 2005.

LAMBRECHTS, S.A.; DEMIDOVA, T.N.; AALDERS, M.C.; HASAN, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice. **Photochem Photobiol Sci**, v. 4, n. 7, p. 503-509, 2005.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, p. 3-10, 2000.

LOESCHE, W.J. Cárie Dental, uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.

MA, J.; JIANG, L. Photogeneration of singlet oxygen (1O_2) and free radicals by tetra-brominated hypocrellin B derivative. **Free Radic Res**, v. 35, p. 767-777, 2001.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.N.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10^a ed. São Paulo: Pearson-Prentice Hall, 2004.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, p. 34-39, 2001.

MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Photochem. Photobiol J**, v. 14, p. 262-266, 1990.

MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **J Photochem Photobiol B**, v. 14, p. 262-266, 1992.

MANYAK, M.J. Photodynamic therapy: present concepts and future applications. **Câncer J**, v. 3, p. 104-109, 1990.

MAVROGIANNIS, M.; THOMASON, J.M.; SEYMOUR, R.A. Lasers in periodontology. **Dent Update**, v. 31, n. 9, p. 535-8, p. 541-2, p. 545-547, 2004.

MILLSON, C.E.; WILSON, M.; MACROBERT, A.J.; BEDWELL, J.; BOWN, S.G. The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Med. Microbiol**, v. 44, p. 245-252, 1996.

MINNOCK, A.; VERNON, D.I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J.H.; BROWN, S.T. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. **J Photochem Photobiol B**, v. 32, p. 159-164, 1996.

MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem Photobiol**, v. 53, p. 549-53, 1991.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.H. **Microbiologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 1992.

MUTO, C.A.; JERNIGAN, J.A.; OSTROWSKY, B.E.; RICHET, H.M.; JARVIS, W.R.; BOYCE, J.M. et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 24, n. 5, p. 362-386, 2003.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1994.

NITZAN, Y.; ASHKENAZI, H. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. **Curr Microbiol**, v. 42, p. 408-414, 2001.

NYMAN, E.S.; HYNINEN, P.H. Reserch advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 73, p. 1-28, 2004.

OLDHAN, T.C.; PHILLIPS, D. Flash photolysis of sensitizers in microbes. **J Phys Chem B**, v. 103, n. 43, p. 9333- 9349, 1999.

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect on He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Laser Surg Med**, v. 12, n. 4, p. 450-458, 1992.

ORENSTEIN, A.; KOSTENICH, G.; ROITMAN, L., et al. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. **Br J Cancer**, v. 73, p. 937-944, 1996.

ORTH, K.; RUCK, A.; STANESCU, A.; BEGER, H.G. Treatment of inoperable oesophageal tumours by intralesional photodynamic therapy with methylene blue. **Lancet**, v. 345, p. 519-520, 1995.

PAARDEKOOPER, M.; DE BRUIJNE, A.; VAN STEVENICK, J.; VAN DEM BROEK, P.J. Intracellular damage in cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. **Photochem Photobiol**, v. 61, n. 1, p. 84-89, 1995.

PAULINO, T.P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI, J.R.G.; TEDESCO, A.C. Use of hand held photopolymerizer to photoinactive *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biol**, v. 50, p. 353-359, 2005.

PELCZAR, J.R.; et al.. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**, 2.ed. São Paulo: Makron Books do Brasil Editora Ltda, 1997. 2v.

POURZARANDIAN, A.; WATANABE, H.; RUWANPURA, S.M.; AOK, I A.; ISHIKAWA, I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 187-193, 2005.

RAAB, O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. **Z Biol**, 39: 524-46; 1900 *apud* MAISCH, T.; et al. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v.4, p.1542-1552, 2005.

ROBERT, J *et al.* Methylene azul in surgery of primary hyperparathyroidism. **Ann. Endocrinol**, v. 59, p. 23-26, 1998.

ROVALDI, C.R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N.A.; FRIDEN, P.M.; ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 12, p. 3364-3367, 2000.

SADER, H.S. Resistencia antimicrobiana en Latinoamerica: ¿cómo estamos? **Rev Chilena Infectol**, v. 19, p. 5-13, 2002.

SCHMIDT, H.; SCHLORICKE, E.; FISLAGE, R.; SCHULZE, H.A.; GUTHOFF, R. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. **Zentbl. Bakteriol**, v. 287, p. 135-145, 1998.

SMETANA, Z.; PASTERNAK, E.; VAN LIER, J.E.; BEN HUR, E.; SALZBERG, S.; MALIK, Z. Photodynamic inactivation of Herpes viruses with phtalocyanine derivatives. **Photohiol Photochem B J**, v. 1, p. 37-43, 1994.

SOUKOS, N.S.; FYVIE, L.A.X.; HAMBLIN, M.R, SOCRANSKY SS, HASAN T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicro. Agents Chemoter**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SUNDQVIST, G.; FIDGOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg**, v. 85, p. 86-93, 1998.

SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J.; *et al.* Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v.205, p. 139-146, 2001.

TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 196-203, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **J Photochem Photobiol B**, v.71, n.1-3,p.87-98, 2003.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**, v. 73, p. 672-682, 1994.

VERONESI, R; et al.. **Tratado de infectologia**, São Paulo: Atheneu, 1996.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; GASKELL, M.; MARSHALL, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* **J Antimicrob Chemother**, v. 44, n. 6, p.823-825, 1999.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; LAYCOCK, S.L.; WAREING, D.R.; WRIGHT, P.A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 160, p. 177–181, 1998.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; MARLAND, J.; WAREING, D.R.; BOLTON, F.J. In-vitro photobactericidal activity of aminoacridines. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, n. 4, p. 587-589, 1997.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitisation of oral bacteria to killing by low-power laser irradiation. **Curr. Microbiol**, v. 25, p. 77-81, 1992.

WISE, R.; HART, T.; CARS, O.; et al.. Antimicrobial resistance. **Br Med J**, v. 317, p. 609-610; 1998.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 4, p. 680-684, 2006.

WOODFORD, N. Glicopeptide-resistente enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 849-862, 1998.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D.; PURCELL, W. M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. **Br J Dermatol**, v. 146, n.4, p.568-573, 2002.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **Br J Dermatol**, v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001.