



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO DIODO EMISSOR DE LUZ
(LED) EMITINDO EM 460 nm ASSOCIADO À CURCUMINA NA
FOTOSENSIBILIZAÇÃO LETAL DE *Candida albicans* E DE
Aggregatibacter actinomycetemcomitans.”**
ESTUDO “IN VITRO”

ORLEY ARAÚJO ALVES

Belo Horizonte, 01 de março de 2011

Orley Araújo Alves

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO DIODO EMISSOR DE LUZ
(LED) EMITINDO EM 460 nm ASSOCIADO À CURCUMINA NA
FOTOSENSIBILIZAÇÃO LETAL DE *Candida albicans* E DE
Aggregatibacter actinomycetemcomitans.”
ESTUDO “*IN VITRO*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

(Departamento de Engenharia Mecânica - UFMG)

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2011

Dedico a minha mãe.
Pelo amor, carinho e incentivo... sempre.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

As colegas Dra. Betânia Soares e Dra. Mila Fernandes pela inestimada ajuda ao longo do trabalho, e também pela amizade cultivada.

Ao Prof. Dr. Marcos Pinotti pela dedicação e paciência na orientação deste trabalho.

Ao prezado amigo, Prof. Dr. Gerdal Sousa pelo apoio, incentivo e palavra amiga em todos os momentos.

Aos amigos, Profs. Drs. Marcos Ferreira e Lívio Barros pela constante preocupação e companheirismo.

À Prof. Dra. Patrícia Silva Cisalpino e ao Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, ambos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela gentileza e colaboração na disponibilização da utilização dos respectivos laboratórios.

Ao Sr. Jamil do laboratório de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela ajuda e paciência na utilização do espectrofotômetro.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Disse Deus: “Haja luz”; e
houve luz. Deus viu que a luz
era boa, e separou a luz das
trevas”.*

(Gênesis 1:3,4)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS E QUADROS	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES	11
RESUMO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Fontes de luz na aPDT	19
2.1.3 Mecanismo de ação da aPDT	22
2.1.4 Fotoabsorvedores	28
2.1.5 Curcumina (açafraão-da-Índia - <i>Curcuma longa</i> L.)	32
2.2 Doenças microbianas bucais humanas	35
2.2.1 <i>Candida albicans</i>	37
2.2.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	38
2.2.3 APDT em doenças microbinas orais	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Materiais	43
4.2 Métodos	45
4.2.1 Primeira etapa: Preparo das soluções	46
4.2.2 Segunda etapa: Inativação fotodinâmica <i>in vitro</i>	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Obtenção das soluções	54
5.2 Procedimento <i>in vitro</i> para avaliação do LED associado à Curcumina como fotossensibilizador	58
6 CONCLUSÃO	66
ABSTRACT	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 LED emissor de luz azul	20
FIGURA 2.2 Fotopolimerizadores com lâmpada halógena azul.	21
FIGURA 2.3 Aparelhos com LED azul para fotopolimerização ou clareamento dental.	21
FIGURA 2.4 Representação esquemática da reação fotodinâmica. Fótons de energia apropriada são absorvidos por um fotossensibilizador, que ativado interage com o oxigênio no estado fundamental produzindo oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (ROS).	22
FIGURA 2.5 Esquema representando as reações do Tipo I (Transferência de elétrons)	23
FIGURA 2.6 Esquema representando as reações do Tipo II (Transferência de energia)	24
FIGURA 2.7 Diagrama de Jablonski	24
FIGURA 2.8 Curva de resposta bifásica. Resposta em função da dose (curva de Arndt-Schulz)	27
FIGURA 2.9 Espectros de absorção do azul de metileno em água.	30
FIGURA 2.10 Açafroeira, raiz do açafrão e extrato em pó contendo Curcumina como principal pigmento.	32
FIGURA 2.11 Fórmulas estruturais dos curcuminóides.	33
FIGURA 2.12 Esquema representando as etapas da terapia fotodinâmica em bolsa periodontal	39
I) A - bolsa periodontal; B – biofilme subgingival	
II) Aplicação do fotossensibilizador	
III) Irradiação com <i>laser</i> através da fibra óptica	
FIGURA 3.1 Equipamento de LED AZUL Twin Flex (MM Optics – São Carlos, Brasil).	43
FIGURA 3.2 Espectrofotômetro: UV-160 A Shimadzu – Japão	43
FIGURA 3.3 Espectrofotômetro: B542 Micronal – São Paulo/BR	44
FIGURA 3.4 Power Meter - NOVA – Ophir Optronics – Israel	44
FIGURA 3.5 Microrganismos utilizados no experimento (<i>Candida albicans</i> e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>).	44
FIGURA 3.6 Soluções de Curcumina nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 μ Molar.	45

FIGURA 3.7 pHmetro DIGMED	45
FIGURA 3.8 Medidas do pH das soluções de curcumina.	46
FIGURA 3.9 Medida da potência do LED.	46
FIGURA 3.10 Diagrama da metodologia para <i>Candida albicans</i> .	47
FIGURA 3.11 Diagrama da metodologia para <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	48
FIGURA 3.12 Medida da transmitância do inóculo .	48
FIGURA 3.13 Sequência de preparo do inóculo de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	49
FIGURA 3.14 Placa opaca com os grupos sendo irradiados pelo LED.	50
FIGURA 3.15 Diluições das suspensões em <i>Eppendorfs</i> .	51
FIGURA 3.16 Procedimento de semeadura do meio com os microorganismos na placa de <i>Petri</i> .	52
FIGURA 3.17 Placas de <i>Petri</i> em jarra microaerófila e estufa a 37°C.	52
FIGURA 3.18 Estufa a 35°C para armazenagem das placas de <i>Petri</i> .	52
FIGURA 3.19 Marcação na placa de <i>Petri</i> para contagem visual das UFCs.	53
FIGURA 4.1 Medidas da absorção óptica inicial das soluções de curcumina.	55
FIGURA 4.2 Medidas da absorção óptica final das soluções de curcumina.	55
FIGURA 4.3 Resultados das medidas do pH das soluções de Curcumina em diferentes concentrações.	56
FIGURA 4.4 Verificação da potência do LED utilizando medidor de potência POWER METER (NOVA- Israel).	56
FIGURA 4.5 Medidas da potência do LED no intervalo de 10 minutos	57
FIGURA 4.6 Gráfico de dispersão dos valores obtidos na verificação da potência do LED.	57
FIGURA 5.7 Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) em <i>Candida albicans</i> (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm (\pm 10nm). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 150 μ M (G 3), 100 μ M (G 4), 50 μ M (G 5) e 25 μ M (G 6), sem irradiação da luz; Irradiação LED com C (APDT) a 150 μ M (G 7), 100 μ M (G 8), 50 μ M (G 9) e 25 μ M (G 10).	59
FIGURA 5.8 Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) em <i>A. actinomycetemcomitans</i> (FDCY4), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm (\pm 10nm). G 1: controle da bactéria sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição da bactéria à C a 150 μ M (G 3), 100 μ M (G 4), 50 μ M (G 5) e 25 μ M (G 6), sem irradiação da luz:	60

curcumina. Irradiação LED com C (APDT) a 150 μ M (G 7), 100 μ M (G 8), 50 μ M (G 9) e 25 μ M (G 10).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

FIGURA 4.9 Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) em *Candida albicans* (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm (± 10 nm). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 3 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 50 μ M (G 3), 25 μ M (G 4), sem irradiação da luz. Irradiação LED com C (APDT) a 50 μ M (G 5) e 25 μ M (G 6).

62

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

FIGURA 4.10 Amostras de *Candida albicans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 6 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 7 a 10 não é observado crescimento de UFCs.

62

FIGURA 4.11 Amostras de *Candida albicans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 4 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 5 e 6 não é observado crescimento de UFCs.

63

FIGURA 4.12 Amostras de *A. actinomycetemcomitans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 6 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 7 a 10 não é observado crescimento de UFCs.

63

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 2.1 Vias fotocitotóxicas das células microbianas.	25
TABELA 3.1 Tabela dos grupos utilizados no primeiro experimento, sua descrição e simbologia utilizada.	50
TABELA 3.2 – Tabela dos grupos utilizados no experimento e sua descrição e simbologia utilizada.	51
TABELA 4.1 Medidas descritivas da média, menor e maior valor em Log ₁₀ UFC/mL da redução do número de células viáveis de <i>Candida albicans</i> para cada grupo.	59
TABELA 4.2 Medidas descritivas da média, menor e maior valor em Log ₁₀ UFC/mL da redução do número de células viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> para cada grupo.	60
TABELA 4.3 Medidas descritivas da média, menor e maior valor em Log ₁₀ UFC/mL da redução do número de células viáveis de <i>Candida albicans</i> para cada grupo.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

A: Área

Aa: Actinobacillus actinomycetemcomitans

AM : Azul de metileno

APDT : Antimicrobial Photodynamic Therapy (Terapia fotodinâmica antimicrobiana)

AsGaAl: Arseneto de gálio alumínio

ATCC : American Type Culture Collection

°C: Graus Celsius

cm: Centímetro

cm² : Centímetro quadrado

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

E : Energia

et al., e colaboradores

EUA: Estados Unidos da América

ex: Exemplo

F : Fluência

FDA : Food and Drug Administration (Administração Americana de Alimentos e Drogas)

FIG.: Figura

FS: Fotossensibilizador

H₂O₂: Água oxigenada

HeNe: hélio-neônio

Hz: Hertz

I: Intensidade

J: joules

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

LED: Light Emitting Diode – Diodos Emissores de Luz

LASER : Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

HILT: High intensity laser treatment (Tratamento com laser de alta energia)

LILT: Low intensity laser therapy (Terapia com laser de baixa energia)

Log : Logaritmo

m: Metro

mg: Miligramas

mL: Mililitro
 mW: Miliwatts
 mW/cm²: Miliwatts por centímetro quadrado
 µg/mL: Microgramas por mililitro
 µM : Micromolar
 µm: Micrômetro (10⁻⁶)
 Nd:YAG : Neodímio: ítrio, Alúinio, Granada.
 nm: Nanômetro (10⁻⁹)
 ns : Nanosegundos
¹O₂ : Oxigênio no estado singlete
³O₂: Oxigênio no estado tripleto radical
 O₂⁻ : Ânion superóxido
 OCl⁻ : Ânion hipoclorito
 OH⁻ : Ânion hidroxila
 ROO⁻ : Ânion carboxilato
 OH• : Radical livre hidroxila
 P : Potência
 PACT: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana)
 PDT : Photodynamic Therapy (Terapia fotodinâmica)
 PIM: Photodynamic inactivation of microorganisms (Inativação fotodinâmica de microorganismos)
 PIT: Pré irradiation time – Período de pré-irradiação (PPI)
 pH: Potencial hidrogeniônico
 Φ : Rendimento quântico
 Φ_f : Rendimento quântico de fluorescência
 ROS : Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
 s: Segundos
 S₀: Estado eletrônico fundamental
 S₁: Estado eletrônico excitado singlete
 T: tempo
 T₁: Estado excitado tripleto
 TBO – Toluidine Blue O (azul de orto-toluidina)
 TAB.: Tabela
 UFC(s): Unidades formadoras de colônia(s)
 UFC/mL: Unidades formadoras de colônia por mililitro
 UV : Ultra-violeta

V: Volts

W: watts

W/cm²: watts por centímetro quadrado

λ : Lambda (comprimento de onda)

% : Porcentagem

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana consiste em uma promissora técnica a ser utilizada como coadjuvante no tratamento de infecções orais. O tratamento se baseia na administração tópica de um fotossensibilizador que se acumula nas células microbianas, e na presença de luz de comprimento de onda adequado e oxigênio, promove reações fotoquímicas produzindo espécies químicas que levam a sensibilização letal dos microrganismos. Atualmente, na maioria dos consultórios odontológicos existem aparelhos emissores de luz que podem ser de dois tipos; aqueles que utilizam como fonte de luz uma lâmpada halógena, e os que empregam diodos emissores de luz (LEDs) também como fonte de luz azul. Estes aparelhos são normalmente utilizados para fotopolimerização de resinas compostas ou acelerar o processo de clareamento dental, e também utilizado na terapia fotodinâmica na inativação de microrganismos, incluindo vários presentes naturalmente na cavidade oral. A Curcumina, conhecida como Açafrão da Índia (*Curcuma longa L.*) apesar de não ser uma planta nativa do Brasil é amplamente utilizada pelos brasileiros seja na medicina popular, como tempero ou como corante alimentício. A Curcumina, em concentrações específicas, quando irradiada por alguns comprimentos de onda, tem um grande efeito fototóxico em bactérias Gram positivas. Neste trabalho foi analisada a eficiência de um equipamento rotineiramente encontrado nos consultórios odontológicos, o LED azul ($\lambda = 450$ a 470 nm), associado um corante de origem natural, a Curcumina, por meio do estudo da susceptibilidade *in vitro*, a inibição fotodinâmica de isolados do fungo *Candida albicans* e da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Foram preparadas soluções aquosas de Curcumina com concentrações reduzidas, e verificada a ressonância entre o corante e a luz emitida pelo equipamento testado. Os resultados obtidos demonstraram que o LED azul associado à Curcumina nos parâmetros utilizados possuem eficiência fotodinâmica na inativação dos microrganismos analisados (redução de Log_{10} 6 UFC/ mL), podendo assim fornecer subsídios para o planejamento de nova alternativa para o tratamento das infecções relacionadas a esses agentes.

Palavras Chaves: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, Curcumina, LED, Terapia fotodinâmica antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (em inglês, *photodynamic therapy - PDT*) consiste na administração tópica ou irrigação com substâncias fotossensibilizadoras (corantes e pigmentos não-tóxicos) e aplicação de luz com comprimento de onda adequado, ou seja, um comprimento de onda ressonante com o espectro de absorção do corante. Em função de suas características, alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (reações químicas ativadas por luz). A interação da luz com esses compostos resulta em espécies químicas reativas capazes de induzir a inativação de células (MEISEL *et al.*, 2005; SOUSA, 2007).

A PDT quando aplicada a microrganismos vem sendo denominada, Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (em inglês, *Photodynamic inactivation of microorganisms - PIM*), Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Photodynamic antimicrobial chemotherapy - PACT*) ou, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT*), e é uma opção complementar, que tem se mostrado bastante promissora na redução de microrganismos orais humanos *in vitro* e *in vivo*. Neste texto será adotada a terminologia aPDT (WAINWRIGHT, 1998; WILSON, 2004; HAYEK *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; PERUSSI, 2007; PRATES *et al.*, 2007, LUAN *et al.*, 2009; SIGUSCH *et al.*, 2010).

A ação dessa terapia se dá quando o agente fotosensibilizante absorve fótons da fonte luz e seus elétrons passam a um estado excitado (singleto). Na presença de um substrato, como por exemplo, o oxigênio, o agente fotosensibilizante, retorna ao seu estado natural (mecanismo tipo I), produzindo radicais livres e várias espécies reativas de oxigênio (em inglês, *Reactive Oxygen Species - ROS*). Alternativamente, o fotoabsorvedor em outro estado excitado (triplete), pode transferir energia para o oxigênio no estado fundamental (mecanismo tipo II), gerando espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singleto (forma excitada do oxigênio), que podem provocar sérios danos a componentes celulares via oxidação irreversível (GARCEZ, *et al.*, 2003; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; USUDA *et al.*, 2006).

A concentração do corante é um fator de relevância para o sucesso da reação fotodinâmica. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deverá produzir danos ao alvo ou as células vizinhas antes da ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). O pH das soluções utilizadas também influencia no processo de fotoativação, pois o fotoabsorvedor apresenta degradação de sua molécula em valores de pH's fora do faixa de estabilidade e, assim, devido a essa alteração química, não promoverá as reações desejadas quando irradiado. O período de pré-irradiação (PPI), que significa o tempo decorrido entre a aplicação do corante no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a

interação desejada. Neste tempo, espera-se que o corante una-se ao microrganismo ou mesmo ultrapasse a barreira da membrana celular. A morfologia microbiana pode variar com as espécies levando as diferenças na localização do fotoabsorvedor (WAINWRIGHT, 1998).

As fontes de luz mais utilizadas na aPDT são o *laser* de baixa intensidade e o Diodo Emissor de Luz (LED), sendo que dentre essas duas fontes de luz, os mais citados são aquele de emissão na região do vermelho (SMIJS *et al.*, 2004).

Atualmente, na maioria dos consultórios odontológicos existem aparelhos emissores de luz que podem ser de dois tipos; aqueles que utilizam como fonte de luz uma lâmpada halógena, e os que empregam diodos emissores de luz (LEDs) também como fonte de luz azul, sendo que esses últimos apresentam várias vantagens em relação aos aparelhos com lâmpada halógena. Estes aparelhos são normalmente utilizados para fotopolimerização de resinas compostas ou acelerar o processo de clareamento dental, e também utilizado na terapia fotodinâmica na inativação de microrganismos, incluindo vários presentes naturalmente na cavidade oral (PIRES, 2005).

A microbiota oral humana apresenta mais de 400 tipos de microrganismos, que encontram condições satisfatórias de sobrevivência na boca. Porém, em condições adversas, quando a concentração de determinado microrganismo se eleva, esse pode exacerbar seu potencial patogênico, desequilibrando o sistema e provocando doenças locais como a doença periodontal, cárie e candidíase, entre outras; ou à distância, como por exemplo, a endocardite infecciosa. Em pacientes cardiopatas, as bactérias podem representar um risco cumulativo de endocardite infecciosa (SCHITTINE e FISCHER, 1997).

O aumento da resistência microbiana aos antibióticos constitui um dos aspectos negativos na evolução da terapêutica antimicrobiana. Este aumento pode ser causado por vários fatores, tais como, a prescrição indiscriminada pelos profissionais de saúde, automedicação, na conservação de carne e cultivo de vegetais em estufa. Assim, é preciso a utilização de doses cada vez maiores ou ainda, de medicamentos com maior espectro de ação, que podem provocar efeitos colaterais indesejáveis. Dessa forma, é importante o estudo de técnicas que possam oferecer uma alternativa ao uso desses fármacos (CHAN *et al.*, 2003; SOUKOS *et al.*, 2003; WAINWRIGHT *et al.*, 2004).

A utilização de medicamentos com princípios ativos naturais vem ganhando cada vez mais destaque no mundo. Nesse sentido, o Brasil vem obtendo grande destaque nos últimos anos, devido à flora ser rica em plantas medicinais empregadas para um grande número de doenças. Várias plantas utilizadas na medicina popular têm sido alvo de pesquisas e algumas têm demonstrado atividade farmacológica, nas quais estão sendo utilizadas na forma de extratos brutos, infusões ou em outras formas farmacêuticas e muitas delas sem qualquer evidência científica da eficácia. Sabe-se que há uma forte tendência à utilização de corantes naturais em substituição aos

sintéticos, não só na indústria farmacêutica, mas também em outros segmentos industriais como o farmacêutico e o alimentício devido a menores riscos quanto à toxicidade, interação (e não exploração) com a biodiversidade além de fatores ligados a questões sócio políticas (VIEGAS JR. e BOLZANI, 2006).

O estudo para a busca de fotoabsorvedores naturais e a avaliação da sua eficiência fotoquímica visando possível aplicação em aPDT são ainda pouco explorados. Em estudos preliminares vários extratos naturais apresentaram capacidade de absorver luz na região de 600 a 800 nm, região útil e de interesse para aplicação em terapia fotodinâmica, demonstrando assim promissora atividade fotoquímica e potencial atividade antimicrobiana (Çalis *et al.*, 2009).

O objetivo geral deste estudo é avaliar a eficiência do Diodo Emissor de Luz (LED) emitindo entre 450 a 470 nm associado à curcumina, um corante natural obtido a partir do Açafrão da Índia, na inativação *in vitro* da levedura *Candida albicans* e da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, por meio da terapia fotodinâmica antibacteriana (aPDT). Sendo subdividido em dois objetivos específicos: 1) Identificação da absorção óptica e do pH de soluções aquosas de Curcumina em diferentes concentrações. 2) Avaliar o efeito da fluência irradiada pelo LED e da concentração da Curcumina na inativação dos microrganismos por meio da aPDT.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

2.1.1 Histórico

O termo “terapia fotodinâmica” não é muito antigo, porém a utilização da luz como terapia no tratamento de algumas enfermidades tem sido utilizada desde tempos bastante remotos. Civilizações do antigo Egito e Índia empregavam a terapia da luz solar em doenças de pele, em combinação com preparados de extratos de plantas. O filósofo grego Heródoto chamava essa conduta de *Helioterapia* (GARCEZ, 2002).

A primeira publicação da ação de corantes em terapia fotodinâmica ocorreu em 1900 por Oscar Raab, na qual esse autor descreveu que a acridina juntamente com a luz atuava sobre *Paramecia*, e provocava a morte desse organismo unicelular. Então o termo *Photodynamische Wirkung* (em português, efeito fotodinâmico) foi cunhado, por von Tappeiner e Jodlbauer, para todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotoabsorvedor que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de tecidos (OCHSNER, 1997; ACKROYD *et al.*, 2001; PERVAIZ, 2001).

Em 1976, Weishaupt *et al*, postularam que o oxigênio no seu estado excitado (singleto), gerado por sensibilização, a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado excitado (triplete) para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais.

Dougherty e colaboradores (1975) reportaram que o derivado da hematoporfirina (HpD) em combinação com luz vermelha poderia erradicar completamente o crescimento do tumor mamário em ratos. A partir desses trabalhos a terapia fotodinâmica passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer, empregada com sucesso no tratamento de tumores, além de outras condições clínicas.

Hoje, além dos efeitos fotoquímicos serem usados para cânceres, há vários outros métodos fotodinâmicos de indicações médicas já em uso habitualmente ou em estudos experimentais, tais como em dermatologia, oftalmologia, gastroenterologia, cardiologia. Além disso, microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus também podem absorver o fotoabsorvedor e serem inativados por luz visível apropriada, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (em inglês, *Photodynamic Inactivation* - PDI), Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* - PACT), ou

ainda, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy* aPDT). A aplicabilidade dessa técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários como já citado, mas foi abandonada devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina. O retorno da aplicação antimicrobiana da terapia fotodinâmica na última década é resultado principalmente do enorme crescimento da resistência bacteriana aos fármacos. Nos últimos anos foi publicado um grande número de estudos, que descrevem a morte de bactérias periodontopatogênicas através de métodos fotodinâmicos. O objetivo desses estudos, principalmente experimentais, é a introdução da terapia fotodinâmica na prática da periodontia, como um coadjuvante no tratamento das doenças periodontais (WAINWRIGHT , 2002; MEISEL *et al*, 2005; SOUSA, 2007; TAVARES *et al.*, 2010).

2.1.2 Fontes de luz na aPDT

De acordo com Ackroyd *et al.* (2001), as primeiras fontes de luz utilizadas eram lâmpadas convencionais, com luz não-coerente, policromática e forte componente térmico associado. Com o desenvolvimento do *laser*, este se mostrou mais eficiente que lâmpadas comuns, para uso em terapia fotodinâmica. O *laser* produz luz monocromática com comprimento de onda específico, o que o torna altamente seletivo aos corantes. A dose de radiação é facilmente calculada e a área da radiação pode ser bem controlada.

O *laser* foi desenvolvido comercialmente na década de 60, sendo uma fonte luminosa capaz de emitir simultaneamente luz monocromática, coerente e colimada. Monocromaticidade significa que o *laser* emite luz de uma só frequência (ou comprimento de onda), ou de algumas poucas bandas de frequência muito próximas. Coerência indica que as diferentes ondas elementares de um feixe de luz apresentam a mesma frequência, fase e direção de propagação, ou seja, um feixe de fótons que são cópias idênticas uns dos outros. Um feixe de luz coerente caracteriza pelo paralelismo de suas ondas. Luz colimada, quer dizer, um feixe luminoso praticamente paralelo com divergência mínima (GUTKNECHT *et al*, 2004).

Atualmente encontra-se no mercado basicamente duas categorias de *lasers*: *laser* de alta intensidade de energia (em inglês, *high intensity laser treatment* - HILT) e *laser* terapêutico ou de baixa intensidade (em inglês, *low intensity laser therapy* - LILT). O *laser* em alta intensidade é utilizado em terapias mais invasivas, como por exemplo, procedimentos cirúrgicos, causando destruição celular pelo efeito fototérmico, desnaturando o conteúdo protéico celular, coagulando, vaporizando o conteúdo hídrico da célula e carbonizando o tecido. O *laser* em baixa intensidade é utilizado em terapias que não necessitam ou que não se deseja o efeito fototérmico, induzindo ao

aumento da circulação local, ação antiedematosa, ação antiálgica e proliferação celular (BRUGNERA *et al.*, 2003).

Os *lasers* emitem comprimentos de onda que podem ser classificados em três grupos: Espectro entre 140 e 400 nm - faixa ultravioleta, espectro entre 400 e 700 nm - luz visível e espectro acima de 700 nm - faixa infravermelha (MELLO e MELLO, 2001). As primeiras fontes de luz utilizadas na aPDT eram lâmpadas convencionais, com luz não-coerente, policromática e divergente que provocavam aquecimento do tecido. A vantagem do uso do *laser* de baixa intensidade na terapia fotodinâmica antimicrobiana, é que maiores densidades de energia podem ser distribuídas em menor tempo de exposição (WILSON *et al.*, 1994; ACKROYD *et al.*, 2001).

Vários tipos de *lasers* foram utilizados ao longo dos anos na terapia fotodinâmica, como os de argônio ($\lambda = 488$ nm e 514,5 nm), de hélio-neônio (HeNe), de vapores de metais e de diodo, normalmente com comprimentos de onda próximos ao do vermelho visível. O *laser* de alta intensidade não é o mais indicado, pois o efeito fototérmico pode mascarar os efeitos fotoquímicos desejados na terapia fotodinâmica, além disso, há o risco de aumento de temperatura na superfície radicular e de danos aos tecidos circundantes (GARCEZ, 2002).

Os Diodos Emissores de Luz (em inglês, *Light Emitting Diode - LED*), são estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção, por diferença de cargas, ocorre a emissão de luz, sem aumento de temperatura (FIG 2.1). Estes dispositivos emitem luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes, diferindo-se dos *lasers*, que produzem emissão estimulada de radiação. Desta distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos (KARU, 2003).



FIGURA 2.1 - LED emissor de luz azul
FONTE - www.infoleds.wordpress.com
(acesso em 31/08/2010)

Uma característica importante observada na radiação emitida pelos LEDs é que, em lugar de sua frequência ser aleatória, como no caso da lâmpada incandescente que se espalha pelo espectro, ela tem uma frequência muito bem definida, que depende do tipo de material usado no

semicondutor. Os *LEDs* podem ser configurados para produzir comprimentos de onda múltiplos, podendo ser arranjados em larga escala, não produzindo calor (STHAL *et al.*, 2000).

Na maioria dos consultórios odontológicos existem aparelhos emissores de luz usados para ativar resinas compostas (materiais restauradores) ou auxiliar no clareamento dental. Esses aparelhos emitem luz azul e são de grande utilização na prática clínica. Desta forma, se houver um corante para ser usado com essa fonte de luz o custo do processo seria menor. Esses aparelhos podem ser de dois tipos: aqueles que utilizam como fonte de luz uma lâmpada halógena, associada a filtros que possibilitam a emissão de luz região do azul no espectro eletromagnético com comprimento de onda entre 400 e 500 nm, e os que empregam diodos emissores de luz (*LEDs*), que emitem numa estreita faixa de comprimento de onda, entre 450 e 490 nm (MILLS *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2003; PIRES, 2005).

Aparelhos de lâmpada halógena (FIG. 2.2) representam a fonte de luz mais conhecida e utilizada pelos profissionais, por isso é denominada como convencional. Este tipo de aparelho emite uma luz incandescente e, basicamente, compõe-se de lâmpada com filamento de tungstênio (bulbo de quartzo e refletor), filtro, utilizado com o intuito de remover o calor e os comprimentos de onda que não estejam na faixa do violeta-azul, sistema de refrigeração (ventilação) e fibras ópticas para condução da luz (MEDEIROS, 2001).



FIGURA 2.2 – Fotopolimerizadores com lâmpada halógena azul.
 FONTE - www.netdental.com.br (acesso em 15/09/2010)

Os *LEDs* (FIG. 2.3) possuem algumas vantagens como a não necessidade de sistemas de filtro; a possibilidade de fabricação de dispositivos menores; consumo baixo de energia; vida útil longa; geração de baixa quantidade de calor, e, em alguns casos, a não necessidade de ventilador (CHAN *et al.*, 2003).



FIGURA 2.3 – Aparelhos com LED azul para fotopolimerização ou clareamento dental.
 FONTE - www.odontomedico.com.br (acesso em 15/09/2010)

2.1.3 Mecanismo de ação da aPDT

Para que se entenda melhor o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica, é importante uma compreensão de alguns conceitos físico-químicos em relação à estrutura eletrônica dos átomos e moléculas, luz, espectro eletromagnético e espectroscopia, que estão abordados no anexo A.

A base da terapia fotodinâmica consiste na interação da luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico, denominado fotoabsorvedor (FS), e oxigênio (FIG. 2.4). O FS no estado fundamental (S_0) absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um nível eletrônico de maior energia (estado excitado singleto), do qual aquele agente pode retornar ao estado fundamental por processos radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistemas ou relaxações vibracionais). Dentre estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica (transição proibida por spin, onde o fotoabsorvedor no estado eletrônico excitado singleto (S_1) sofre uma transição para o estado excitado tripleto (T_1). O fotoabsorvedor no estado tripleto apresenta um tempo de vida maior do que no estado singleto, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin. Dessa forma, na presença de um substrato, como o oxigênio, o FS no estado T_1 , ao retornar ao estado fundamental S_0 , transferindo energia, resulta em espécies químicas reativas capazes de oxidar biomoléculas e induzir a morte de células. A luz e o composto sozinhos não são tóxicos. Dessa forma, as células somente serão afetadas quando absorverem o fotoabsorvedor e receberem uma dose conveniente de radiação (WOOD *et al.*, 1999).

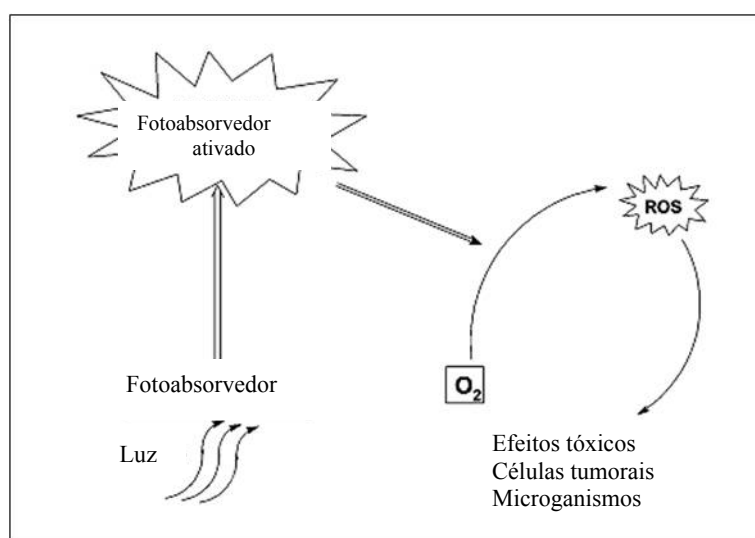


FIGURA 2.4 - Representação esquemática da reação fotodinâmica. Fótons de energia apropriada são absorvidos por um fotoabsorvedor, que ativado interage com o oxigênio no estado fundamental produzindo oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (ROS).

FONTE: Adaptado de KANOPKA *et al.*, 2007

O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica propriamente dito decorre primariamente da excitação eletrônica do corante pela luz de comprimento de onda adequado. Neste processo fotofísico deve haver ressonância entre a luz e o fotoabsorvedor, ou seja, o comprimento de onda da luz necessária para promover a foto-excitação tem que estar na mesma faixa de absorção do agente sensibilizante. Em seguida, ocorrem dois tipos principais de reação, a partir do seu estado excitado:

a) Reação tipo I

O fotoabsorvedor (FS) no estado excitado singlete (S_1 ; de vida curta) interage diretamente com um substrato orgânico (A) e/ou outras moléculas vizinhas, produzindo radicais livres ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons (FIG. 2.5). A maioria destes radicais reage instantaneamente com o O_2 , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), íon carboxilato (ROO^-); radical livre hidroxila (OH^\bullet) e íon hipoclorito (OCl^-), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas (OCHSNER, 1997).

A participação desse processo para os fotoabsorvedores atualmente usados em terapia fotodinâmica não ultrapassa 10% dos efeitos totais. Porém, pode haver variação desta porcentagem, dependendo das características do FS como da natureza da célula sensibilizada. (AKHMANOV *et al.*, 1990).

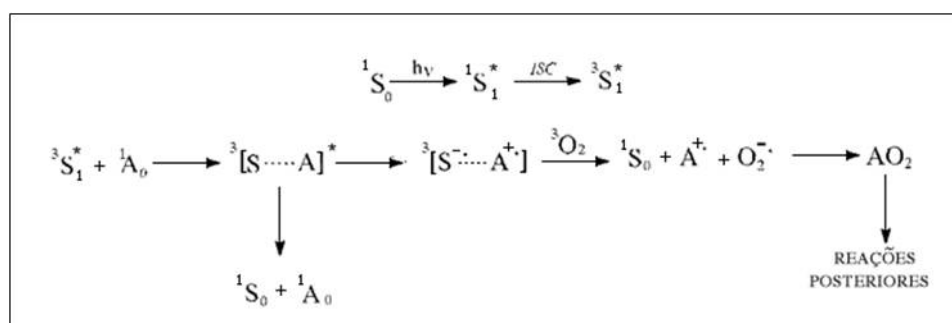


FIGURA 2.5 - Esquema representando as reações do Tipo I (Transferência de elétrons)
 FONTE - MACHADO, 2000

b) Reação tipo II

O FS no estado excitado tripleto (T_1) pode reagir com moléculas de oxigênio no estado fundamental tripleto (3O_2) na sua vizinhança, via um processo de transferência de energia durante uma colisão, levando à produção de oxigênio singlete (1O_2), espécie mais reativa de oxigênio (FIG. 2.6). O oxigênio singlete reage com quase todos os componentes celulares uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação de 1O_2 . Em razão das reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de

elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação. Cada molécula de fotoabsorvedor pode produzir tipicamente 10^3 a 10^5 moléculas de $^1\text{O}_2$ antes de ser degradada através de reação de foto-branqueamento ou por algum outro processo (GROSSWEINER *et al.*, 1982; OCHSNER, 1997).

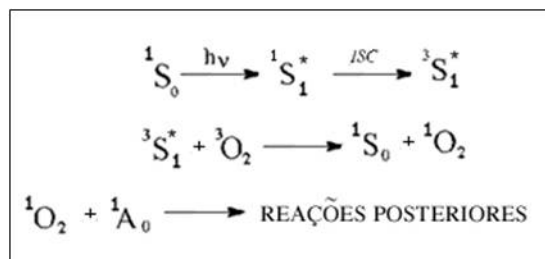


FIGURA 2.6 - Esquema representando as reações do Tipo II (Transferência de energia)
 FONTE - MACHADO, 2000

O fator que determina se vai ocorrer reação do Tipo I ou Tipo II, é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do FS (BORISSEVITCH *et al.*, 2006).

Os processos (mecanismos Tipo I e II de geração de ROS e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que ocorrem através das interações entre a luz, o fotoabsorvedor (S) e oxigênio no estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$), podem ser mais facilmente compreendidos através da análise do diagrama de níveis de energia da molécula do fotoabsorvedor, também conhecido por diagrama de Jablonski (FIG. 2.7).

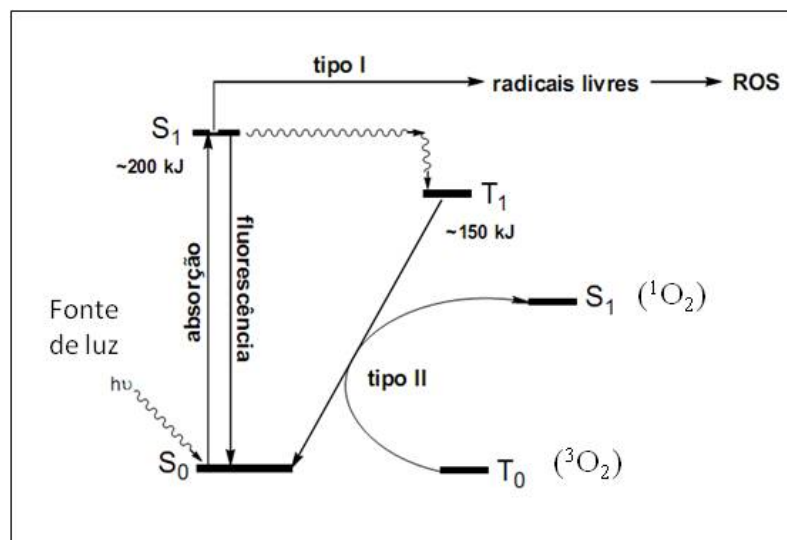


FIGURA 2.7 - Diagrama de Jablonski
 FONTE - RIBEIRO *et al.*, 2007. (modificado)

O tempo de vida do oxigênio singleto é muito curto, aproximadamente 4 μs em água, enquanto que em solventes orgânicos esse tempo é de 4 a 50 vezes maior. Em sistemas biológicos o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é consideravelmente menor, de 100 ns em regiões lipídicas das membranas a

250 ns no citoplasma, em função disto, seu raio de ação é extremamente reduzido (aproximadamente $< 0,02 \mu\text{m}$), ou seja, esta espécie reage no seu sítio de formação. Isto significa que moléculas do fotoabsorvedor não ligadas às células não serão fototóxicas. O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácido nucléicos. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas. Portanto, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte celular via necrose ou apoptose (GORMAN *et al.*, 1992; OCHSNER, 1997; SIBATA *et al.*, 2000).

A eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico, o tempo de vida do estado tripleto do FS e do estado singlete do oxigênio ($^1\text{O}_2$) aumentam. O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) pode ser definido como a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos, ou seja, de moléculas excitadas. O rendimento quântico (Φ) pode também ser analisado pela razão entre o número de partículas danificadas pelo número de fótons absorvidos (AKHMANOV *et al.*, 1990; HULTÉN *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação das reações fotoativadas depende da estrutura molecular do FS e do meio onde está ocorrendo a transferência eletrônica, segundo Wainwright (1998). O fotoabsorvedor no estado tripleto pode ser submetido a várias vias fotocitotóxicas e provocar diferentes eventos citotóxicos dependendo de sua localização, essas vias estão relacionadas no QUADRO (2.1).

QUADRO 2.1
Vias fotocitotóxicas das células microbianas

Áreas de ação	Ação	Resultado	Conseqüência	Efeito citotóxico
Água	Abstração (remoção) do hidrogênio	Formação do radical hidroxila (OH \cdot)	Formação de peróxido e superóxido (O_2^-)	Processos oxidativos adicionais
Parede/membrana celular, lipídeos e esteróides insaturados	Peroxidação	Peroxidação	Formação de hidroperóxido	Permeabilidade aumentada aos íons (perda de Na^+/K^+)
Peptídeos	Abstração do hidrogênio	Ligação cruzada de peptídeos	Inativação enzimática	Perda da facilidade de reparo; lise
Cobertura protéica viral	Oxidação de resíduos de aminoácidos	Degradação de proteínas		Perda da infectividade viral
Cadeia respiratória	Reações de oxidação e redução			Inibição da respiração
Enzimas citoplasmáticas/enzimas	Oxidação ou			Inibição do conjunto ribossômico; inibição da

virais (ex. transcriptase reversa)	ligações cruzadas			replicação/infectividade
Resíduos de ácido nucléico (tipicamente guanosina)	Oxidação da base ou do açúcar	8-hidroxi-guanosina	Degradação nucleotídica; degradação do açúcar/clivagem	Substituição da base/clivagem; partição; mutação; inibição da replicação

FONTE - WAINWRIGHT, 1998, p. 16

A concentração do corante é fator que deve ser levado em consideração para o sucesso da reação fotodinâmica. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deverá produzir danos ao alvo, antes da ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). As concentrações utilizadas variam de um fotoabsorvedor para outro de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade. As concentrações típicas utilizadas em PDT antimicrobiana são da ordem de $\mu\text{g/mL}$ (REYS, 2004).

A aPDT tem seu início quando a molécula do fotoabsorvedor associa-se a superfície da célula-alvo, após incubação em local escuro por determinado tempo, fator pré-requisito para um eficiente processo de fotoinativação. Observa-se que concentrações mais elevadas de fotoabsorvedor podem produzir menores efeitos fototerapêuticos, pois os sítios de ligação do composto as células tornam-se saturados. Assim, não terão eficiência, os fótons formados a partir da excitação das moléculas do corante que não se ligaram a célula-alvo (JAKSON *et al.*, 1999).

O tempo de pré-irradiação (TPI), que significa o tempo decorrido entre a aplicação do corante no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. A morfologia microbiana pode variar com as espécies levando as diferenças na localização do fotoabsorvedor. Nesse tempo deseja-se que o corante seja absorvido pelas células alvo (WAINWRIGHT, 1998). Para a PDT anti-neoplásica, o fotoabsorvedor é aplicado por via endovenosa e o tempo de pré-irradiação pode chegar a 48 horas. Nas aplicações tópicas da PDT, principalmente a antimicrobiana, espera-se que o corante una-se ao microrganismo ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula num tempo de 1 a 10 minutos. Espera-se também que durante esse período, antes da ativação pela fonte de luz, que o fotoabsorvedor não sofra degradação (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Um requisito importante, na fotossensibilização letal, é que o tempo de vida útil do substrato excitado seja suficiente para permitir a interação com as moléculas vizinhas para, assim, produzir espécies citotóxicas. Evidentemente uma das características necessárias no tratamento é que os compostos utilizados possuam toxicidade baixa no escuro e tendência elevada a acumular-se nas células alvo, evitando-se que a vizinhança acidentalmente iluminada seja danificada (WILSON, 1992).

A terapia com luz pode ser comparada a tratamentos que utilizam medicamentos. Tal como acontece com as medicações, a terapia fotodinâmica tem seus ingredientes ativos, os parâmetros de irradiação, e uma “dose” determinada por esses parâmetros. A “resposta bifásica dos medicamentos”, trata-se de um princípio no qual cada medicamento tem duas fases de ação que dependem da dose administrada. Por conseguinte, em vez da eficácia de um medicamento aumentar proporcionalmente com o aumento da dosagem, os estudos têm provado de modo consistente que doses muito pequenas têm o resultado oposto das maiores. Este princípio foi descoberto por Hugo Schulz e Rudolf Arndt em 1870. Inicialmente recebeu o nome de lei de *Arndt – Schulz*, e até hoje tem sido registrado nos dicionários médicos com esta designação. Mais concretamente, estes investigadores descobriram que os estímulos fracos aceleram a atividade normal, os estímulos moderados suspendem-na e os estímulos fortes param-na completamente (CHOW *et al.* 2006; HAWKINS *et al.*, 2006).

A "curva" bifásica (FIG. 2.8) pode ser usada para ilustrar a resposta esperada em relação à dose de irradiação. Essa curva sugere que se a energia não for suficientemente aplicada, não haverá resposta (porque o limite mínimo não foi atingido), se maior quantidade de energia for aplicada então um limiar será cruzado e a bioestimulação será alcançada, mas quando a energia for aplicada em excesso o estímulo desaparece e será substituído pela bioinibição (HUANG *et al.*, 2009).

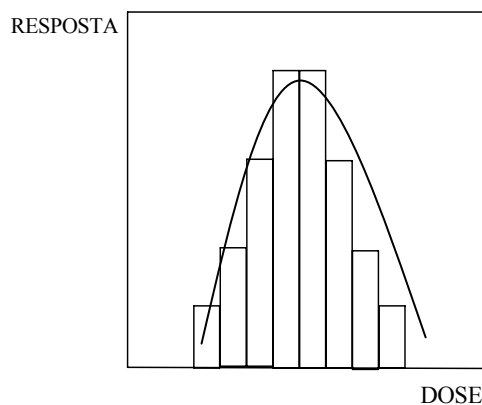


FIGURA 2.8 - Curva de resposta bifásica - Resposta em função da dose (curva de Arndt-Schulz)
 FONTE - HUANG *et al.*, 2009

Os principais parâmetros de irradiação utilizados na terapia fotodinâmica são o comprimento de onda, (λ , expresso em nm), o modo de aplicação (contínuo ou pulsado), tempo de irradiação (T, expresso em segundos), a fluência (ou densidade de energia) e a taxa de fluência (ou irradiância), estes dois últimos serão mostrados em detalhe, a seguir.

A fluência (F), expressa em J/cm^2 , também conhecida como densidade de energia, é calculada utilizando a Eq.(1), a seguir:

$$F = \frac{E}{A} \quad (1)$$

Onde E é a energia total aportada no tecido [J] e A é a área da superfície irradiada [cm²].

A taxa fluência (I), expressa em W/cm², também conhecida como intensidade ou densidade de potência é calculada utilizando a Eq.(2), a seguir:

$$I = \frac{P}{A} \quad (2)$$

Onde P é a potência de irradiação [W] e A é a área da superfície irradiada [cm²] (HAMBLIN *et al.*, 2006).

Os comprimentos de onda mais utilizados nas áreas biomédicas estão na região espectral compreendida entre 600 nm e 1000 nm, conhecida como “janela fototerapêutica” na qual a membrana celular apresenta considerável transparência a radiação eletromagnética, sendo possível boa penetração da luz na pele e nas mucosas, com risco mínimo de destruição generalizada das células sadias que não possuem o agente fotoabsorvedor. A eficácia da radiação está intimamente relacionada com uma dosagem, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que doses baixas ou altas podem não produzir os efeitos desejados ou gerar prejuízos. É necessário um nível mínimo de energia para que as reações sejam ativadas. Além disso, o fato de se irradiar uma área menor ou maior também apresenta influência no processo. Desta forma, a fluência (J/cm²) deve ser prescrita para áreas de spot que desencadeiam as reações desejáveis nos locais escolhidos. Da mesma maneira, a taxa de fluência tem a ver com o tempo de irradiação. Duas fontes de potência distintas, uma de alta e outra de baixa potência, poderão fornecer a mesma fluência desde que sejam aplicadas em tempos diferentes, intervalo curto para o caso da fonte de maior potência. Isto leva a uma janela ótima de aplicação no tempo e no espaço. Esta combinação é a “dose”, que deve ser determinada para cada aplicação (KARU, 1999).

2.1.4 Fotoabsorvedores

Fotoabsorvedores (FS) são substâncias orgânicas ou minerais, naturais ou sintéticas caracterizadas por sua capacidade de absorver luz em variados comprimentos de onda. São compostos que absorvem luz e emitem por excitação, energia que desencadeia processos químicos e físicos, normalmente insensíveis a luz. Existe atualmente uma grande variedade de FS, classificados de acordo com sua estrutura química (Anexo B) (WOEHRLE *et al.*, 1995).

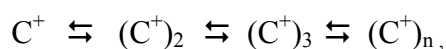
Alguns parâmetros, citados por Moser (1998), devem ser levados em consideração para a utilização e desenvolvimento de agentes fototerapêuticos, tais como:

- I- apresentar produto final de composição química definida e conhecida;

- II- larga banda de absorção óptica;
- III- baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade);
- IV- fotossensibilidade não prolongada;
- V- farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- VI- facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para aperfeiçoar as propriedades desejáveis;
- VII- facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
- VIII- alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade);
- IX- ser termodinamicamente estável;
- X- capacidade de penetração na membrana celular;
- XI- dificuldade de agregação, pois quando difundido em um meio incompatível tende a se agregar através de formação de ligações entre si, criando uma proteção contra o meio e perdem assim o efeito fotodinâmico.

Os espectros de absorção de soluções aquosas homogêneas de fotoabsorvedores básicos ou catiônicos apresentam características fortemente dependentes da concentração. Dimerização é o processo pelo qual duas moléculas (monômeros) se ligam formando um conjunto denominado *dímero*. Se houver a união de três moléculas o conjunto passa a ser chamado de *trímero*, e se ocorrer a união de maior número de moléculas, será formado um *polímero*. Em geral atribui-se ao agregado a forma dimérica. A agregação reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete, desse modo é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solubilizado e na forma monomérica (MOSER, 1998).

Essas formações de agregados em soluções ocorrem, de acordo com o esquema:



onde C^+ representa a molécula de um corante catiônico, $(C^+)_2$ e $(C^+)_3$ são dímeros e trímeros e $(C^+)_n$ representa agregados maiores do corante. As constantes de equilíbrio de dimerização podem chegar a ser da ordem de até 10^4 , o que faz com que muitos corantes apresentem o equilíbrio deslocado no sentido da formação de agregados, mesmo em baixas concentrações (em torno de 10^{-4} mol.L⁻¹). As constantes de agregação dependem do solvente, da temperatura e da força iônica do meio. Os espectros eletrônicos destes agregados são diferentes dos corantes na forma monomérica. As interações entre as moléculas do corante geram níveis eletrônicos com energias diferentes. As regras de transição entre esses novos níveis resultam em modificações nos espectros de absorção, com o aparecimento de novas bandas em comprimentos de onda diferentes. Dependendo da geometria dos agregados são permitidas transições com energias maiores ou menores que as

transições presentes no corante na forma monomérica. Este fenômeno, chamado de metacromasia, está ilustrado na 2.9 que mostra os espectros em solução aquosa homogênea do corante azul de metileno (AM) em três concentrações diferentes. Para a solução mais diluída, observa-se somente uma banda com comprimento de onda máximo em torno de 670 nm, que corresponde aos monômeros de AM. Na medida em que a concentração aumenta, há uma diminuição na intensidade de absorção no comprimento de onda correspondente aos monômeros acompanhada de um gradativo aparecimento de uma nova banda em 605 nm, atribuída aos dímeros do corante. Em concentrações ainda maiores, é possível observar outras bandas em torno de 580 nm que são atribuídas a trímeros e agregados maiores (NEUMANN *et al*, 2000).

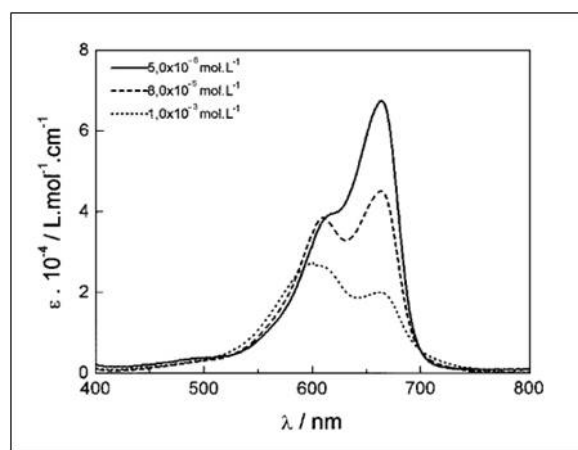


FIGURA 2.9 - Espectros de absorção do azul de metileno em água.
FONTE - NEUMANN *et al*, 2000

Comportamento semelhante é observado para praticamente todos os corantes similares ao azul de metileno, tais como tionina, safranina, vermelho neutro, laranja de acridina, etc. A agregação de corantes iônicos não pode ser atribuída a um tipo específico de interação. Existe a contribuição de efeitos devidos a forças do tipo Van der Waals, ligações de hidrogênio intermoleculares e interações de elétrons pi, sendo na maioria das vezes difícil avaliar a contribuição individual de cada uma dessas interações. Os espectros eletrônicos dos corantes catiônicos em solução aquosa ácida também mudam devido à protonação. O AM em solução ácida apresenta uma banda de absorção intensa na região de 765 nm referente ao monômero protonado acompanhada de outra banda de menor intensidade por volta de 680 nm (NEUMANN *et al.*, 2000).

Lembrando-se do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica, discutido na sessão 2.1.3 desse estudo, é importante que sejam observadas algumas características fotofísicas dos fotosensibilizadores.

Um fator fundamental é o comprimento de onda necessário à fotoexcitação de um determinado composto. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido. Radiação de comprimento de onda menor sofre maior

espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem em comprimentos de onda menores, principalmente a hemoglobina, faz com que a penetração de luz seja menor. Entretanto, radiações com comprimentos de onda acima de 800 nm sofrem a absorção pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite superior (WILSON, 1989).

Um processo adicional que o FS sofre é o de foto-branqueamento, causado por modificações na estrutura da molécula através de reações paralelas. O sentido do termo foto-branqueamento é o de que a molécula do fotoabsorvedor sofrerá reação química e apresentará modificações na sua estrutura, formando um composto que não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando assim de exercer sua ação terapêutica. Dessa forma, o desejado é que algumas propriedades fotofísicas deveriam estar presentes em moléculas utilizadas para a terapia fotodinâmica, tais como: forte absorção de luz na região acima de 650nm, onde a luz apresenta maior penetração no tecido; alto rendimento quântico de estado tripleto; alto rendimento quântico de geração de oxigênio singleto e baixo rendimento de reação de foto-branqueamento (STERNBERG *et al.*, 1998).

Em sua revisão sobre terapia fotodinâmica antimicrobiana, Mark Wainwright (1998) cita que vários fotoabsorvedores são utilizados pela própria natureza a milhares de anos, em processos fotobiológicos relacionados às plantas ou fungos nos processos de defesa ou de metabolismo dessas espécies. Segundo o autor a extração e o processamento de tais pigmentos, como a furanocoumarina e a perilenequinon representam um grande avanço no âmbito da terapia fotodinâmica. Psoralenos extraídos da furanocoumarina têm sido utilizados por centenas de anos na Ásia no tratamento de diversas doenças cutâneas. Recentemente, pesquisadores sintetizaram um tipo de Psoraleno para uso em fotomedicina, particularmente em fotoforese (quimioterapia local extracorpórea) aplicada em linfomas. Segundo o autor o Psoraleno pode ser utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana para inativação de vírus, devido ao fato de ser absorvido pelo DNA viral.

A Curcumina, conhecida como Açafrão da Índia (*Curcuma longa L.*) apesar de não ser uma planta nativa do Brasil é amplamente utilizada pelos brasileiros seja na medicina popular, como tempero ou como corante alimentício. A Curcumina, em concentrações específicas, quando irradiada por alguns comprimentos de onda, tem um grande efeito fototóxico em bactérias Gram positivas (DAHL *et al.*, 1989).

Çalis *et al.* (2009) detectaram a atividade antimicrobiana de corantes naturais obtidos de Agarança (*Rubia tinctorum*), Cebola (*Allium cepa*), Romã (*Punica granatum*) e Ortelã (*Mentha sp.*), sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus epidermidis* e *Salmonella*. Segundo os autores, o corante extraído da *Punica granatum* foi mais efetivo contra

todas as bactérias exceto contra a *E. colie* e o *S. epidermidis*. Apesar dos trabalhos anteriores não utilizar corantes naturais sob excitação luminosa, apenas verificando a atividade antimicrobiana do produto *in natura*, ou aplicado em tecidos, decidiu-se que a pesquisa de corantes naturais para terapia fotodinâmica pode trazer novos conhecimentos e novos produtos de ação antimicrobiana ao explorar a possibilidade de usá-los como corantes fotoabsorvedores (ressonantes com fontes de luz disponíveis comercialmente) ou simplesmente utilizando-os de forma tópica, caso apresentem atividade antimicrobiana seletiva. Isso ocorreria durante o processo de pesquisa, uma vez que na metodologia dos procedimentos microbiológicos sempre existe um grupo controle onde as culturas de bactérias ou fungos são submetidas a exposição apenas do corante, sem qualquer contato com a luz dos emissores pesquisados.

2.1.5 Curcumina (açafão-da-Índia - *Curcuma longa* L.)

O açafão da Índia (*Curcuma longa* L.), planta herbácea nativa da Índia e da Ásia Meridional (FIG. 2.10) introduzida no Brasil pelos colonizadores, pertencente à família *Zingiberaceae*, classificada como planta condimentar produtora de rizomas, é comum ser confundido, no Brasil, com outra espécie, a *Crocus sativus* L., também denominada de açafão, sendo esta, no entanto, conhecida como o açafão verdadeiro. Por esse motivo, parece crescer no meio científico o consenso pela denominação da espécie *Curcuma longa*, de cúrcuma ou curcuma. No entanto, é comum deparar-se com a regionalização do nome comum da espécie, tais como: açafroeira, açafão-da-terra, açafão-daÍndia, batatinha amarela, gengibre dourada, mangarataia. Os rizomas do açafão são tradicionalmente conhecidos no mercado internacional como “*tumeric*”, considerados especiarias por compor os famosos temperos orientais, sendo um dos principais componentes do *curry* (MAIA *et al.*,1995).



FIGURA 2.10 - Açafroeira, raiz do açafão e extrato em pó contendo Curcumina como principal pigmento.
FONTE – [www. lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (acesso em 12/09/2010)

A curcumina é um pigmento que compõe um dos princípios ativos da *Curcuma longa*. É utilizado como um corante natural para alimentos, com o código de aditivo alimentar E100. Foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1842, é um pó insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido). Sua estrutura química foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910. O corante comercial encontrado no mercado contém três curcuminóides que lhe conferem a cor amarelo alaranjada típica: a curcumina (77 %), a demetoxicurcumina (17 %) e a bisdemetoxicurcumina (3 %). Por apresentarem espectro de absorção numa pequena amplitude de 420 a 425 nm, tornou-se prática usual expressar a cor total simplesmente por curcumina. Suas fórmulas estruturais planas estão representadas na FIG. 2.11 (TAKAHASHI,1987; RUSIG *et al.*, 1992).

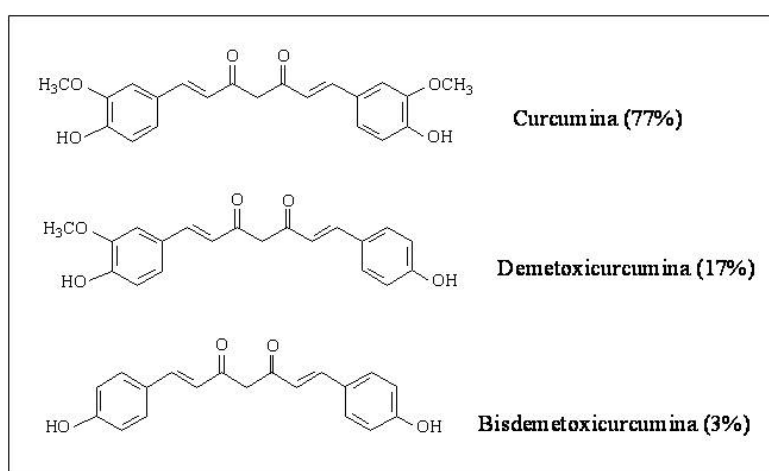


FIGURA 2.11 Fórmulas estruturais dos curcuminóides.

Além de sua atuar como corante, a Curcumina tem sido descrito em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiana e antiinflamatório (ABE *et al.*, 1999; RAMSEWAK *et al.*, 2000; LITERAT *et al.*, 2001).

Com relação à estabilidade da curcumina, Tonnensen *et al.* (1985), verificaram que a curcumina é instável em pH maior que 8,0. Resultados semelhantes foram observados por Rusig *et al.* (1992), os quais constataram a faixa de pH entre 4 e 8 como a que proporcionou maior estabilidade à molécula curcumina e que em pH superior a 8, a velocidade de degradação foi significativamente maior. No mesmo trabalho, os autores estudaram também o efeito da temperatura e observaram que até 100 °C não houve perda significativa de curcumina. Entretanto, a 125°C houve degradação de 15,25 % do pigmento em relação aos teores iniciais.

A Curcumina mostrou-se atóxica em uma série de estudos de cultura celular e em animais. No entanto, para ter efeito bactericida isoladamente deve ser administrada em concentrações muito elevadas. Quando irradiada por luz, apresentou potente ação fototóxica em quantidades micromolares. As bactérias Gram-negativas exibiram maior resistência a fototoxicidade

em relação às bactérias Gram-positivas. O mecanismo de fototoxicidade da Curcumina parece envolver a produção de peróxido de hidrogênio. Na irradiação com luz visível, mostrou-se fototóxico para *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, mesmo em concentrações muito baixas (DAHL *et al.*, 1989).

Azuine *et al.* (1992), demonstraram a administração curcumina na dose de 3 mg/Kg de peso animal inibiu significativamente a carcinogênese induzida por agentes químicos mutagênicos diretos na medula óssea de camundongos.

Várias atividades biológicas que a Curcumina apresenta, foram verificadas por Ruby *et al.* (1995), incluindo atividade anti-proliferativa contra as células cancerosas, atividade antioxidantes, capacidade de cicatrização e atividade antimicrobiana em baixas concentrações (2 a 16 µg/mL). Relatam ainda, ser um composto extremamente ativo na inibição do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos.

O potencial anticarcinogênico da Curcumina advém da sua capacidade para suprimir a proliferação de uma ampla variedade de células tumorais, por meio da regulação de fatores de transcrição, dos receptores do fator de crescimento, das moléculas de adesão na superfície celular, etc. Os ensaios clínicos em humanos não indicaram toxicidade limitante da dose quando administrado em doses até 10g/dia (AGGARWAL *et al.*, 2003).

Um estudo de escalonamento para determinar a dose máxima tolerada de uma única dose de pó de extrato padronizado de Curcumina em humanos foi realizado por Lao *et al.*, (2006). Em voluntários saudáveis foram administradas doses crescentes de 500 a 12.000 mg. Os resultados mostraram que sete dos 24 indivíduos (30 %) apresentaram apenas toxicidade mínima, que não parecem ser dose-dependente. De acordo com os resultados encontrados os autores concluíram que a tolerância à Curcumina em altas doses orais únicas parece ser excelente.

A capacidade de ligação da Curcumina a tubulina (proteínas globulares que compõem os microtúbulos) foi observada por Gupta *et al.* (2006). Os dados do estudo em conjunto sugerem que esse composto pode inibir a proliferação de células cancerosas por perturbação da montagem dinâmica dos microtúbulos e pode ser usado de forma eficaz para a quimioterapia do câncer.

Tem sido demonstrada a capacidade da Curcumina de inativar várias bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus epidermidis* que causam infecções, tais como doenças de pele, pneumonia, meningite e infecções do trato urinário de seres humanos. Além disso, demonstrou-se que a Curcumina, em combinação com a lactoferrina, N-acetilcisteína e pantoprazol têm capacidade de reduzir significativamente os sintomas causados pela infecção por *Helicobacter pylori* em humanos (DI MARIO *et al.*, 2007).

Martins *et al.* (2009), avaliaram a atividade antifúngica de Curcumina em 23 linhagens de fungos *in vitro* e seu efeito inibitório sobre a aderência de espécies de *Candida* spp de células

epiteliais bucais humanas (BEC). As culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* foram as mais suscetíveis a Curcumina, enquanto o crescimento de *Aspergillus* spp não foi afetado, e também, era muito mais eficiente do que o fluconazol em inibir a aderência de espécies de *Candida* spp a BEC, particularmente aquelas cepas isoladas da mucosa vestibular de pacientes com AIDS. Os autores concluíram que a falta de compostos antifúngicos, com efeitos colaterais reduzidos destaca a importância do estudo de produtos naturais para essa finalidade. A Curcumina foi um antifúngico mais potente do que o fluconazol contra o *P. brasiliensis*, o agente causal da paracoccidioidomicose. Além disso, inibiu significativamente a adesão na BEC de espécies de *Candida* spp em pacientes com AIDS, demonstrando ser um composto promissor que merece mais investigação na sua terapêutica em pacientes imunocomprometidos.

O potencial quimiopreventivo de Curcumina em carcinoma de células escamosa induzido na região bucal de hamsters foi investigado por Manoharan *et al.* (2009). Os autores observaram que a administração oral desse composto (80 mg/kg de peso corporal) impediu a formação de carcinoma oral.

Ganta *et al.* (2010), avaliaram o efeito da Curcumina administrado em nanoemulsão na cavidade oral de camundongos portadores de adenocarcinoma de ovário na concentração de 50 mg/kg corporal. Os resultados deste estudo mostraram significativa eficácia na atividade terapêutica anti-tumoral.

2.2 Doenças microbianas bucais humanas

Muitos microrganismos que usualmente habitam a cavidade bucal humana podem se tornar agentes etiológicos de doenças sob certas condições. Estas situações ocorrem quando há um desequilíbrio do sistema, provocando doenças locais como, a doença periodontal, cárie, candidíase e outras, ou à distância, como por exemplo, a endocardite infecciosa (SCHITTINE e FISCHER, 1997).

A cárie dentária é definida como um desequilíbrio nos processos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros do dente por ácidos de origem bacteriana, de íons cálcio e fosfato das superfícies dentárias. Trata-se de uma patologia multifatorial que envolve um hospedeiro suscetível, microbiota cariogênica e uma dieta cariogênica. Estes fatores devem ocorrer simultaneamente durante certo período de tempo para a instalação da carie dental. A bactéria *Streptococcus mutans* é considerada o principal agente etiológico deste processo. O Tratamento pode ser conservador ou restaurador, dependendo da avaliação do tipo de lesão, sua localização e a frequência no paciente (SEIF, 1997).

As doenças periodontais são consideradas respostas inflamatórias às infecções nas estruturas de suporte dos dentes (osso, ligamento periodontal, gengiva e cimento) causadas por bactérias presentes no biofilme dental. As alterações mais frequentes em termos de doença são: gengivite e periodontite. (HAAKE, 1997; DARVEAU *et al.*, 1997; GREENSTEIN, 1990).

As bolsas periodontais podem conter mais de 400 espécies diferentes de bactérias que podem induzir, com potenciais diferentes, a doença periodontal, entretanto, algumas espécies, tais como, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteróides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens*, *streptococcus intermedius* e *Treponema sp*, que podem atuar isoladamente ou em combinações, apresentam um papel mais direto no desenvolvimento da doença (HAFFAJEE *et al.*, 1994).

O tratamento da gengivite ou periodontite atualmente proposto consiste na remoção dos fatores retentivos de placa, que são o próprio cálculo, restaurações ou próteses mal adaptadas, restos radiculares, tecidos cariados, além da instrução ao paciente, de adequada higiene oral. A remoção do biofilme e cálculo supra e subgengival é feita através de raspagens e alisamento da superfície dentária com ultra-som, raspagens manuais com curetas periodontais e em último caso é realizado acesso cirúrgico a bolsas periodontais, corrigindo se necessário, possíveis defeitos ósseos. Dependendo do estágio da doença e resposta do indivíduo à terapia, é comum utilizar-se antibioticoterapia sistêmica e enxaguatórios antibacterianos como coadjuvante ao tratamento, além disso, alguns periodontopatógenos residem em tecidos moles que escapam à remoção mecânica, podendo ser a origem da recolonização rápida da superfície do dente (LINDHE, 1999).

A candidíase é uma infecção causada por levedura das membranas da mucosa da boca e da língua. A afta oral é uma forma de candidíase oral que se vê frequentemente em crianças e que não é considerada anormal. No entanto, a candidíase oral em adultos deve ser sempre considerada anormal e ocorre somente quando as condições que deprimem o sistema imune estão presentes. Dentre elas estão a AIDS, imunodepressão em receptores de transplantes, indivíduos em quimioterapia, portadores de diabetes, idade avançada, más condições de saúde generalizadas, anomalias do sistema imune hereditárias, xerostomia e presença de próteses dentais totais ou removíveis associadas à má higienização. Os sintomas clássicos da candidíase oral incluem o aparecimento de placas esbranquiçadas e aveludadas na membrana mucosa da boca e da língua. Se o material esbranquiçado for eliminado por meio de raspagem, a base pode ficar vermelha (eritematosa) com pontos de sangramento (SCULLY, 1994).

A *Candida albicans* é o fungo que causa a candidíase oral e outras formas de infecção. É um organismo oportunista, o que significa que só invade quando as condições para seu crescimento são ideais (ELLEPOLA, 1998).

O tratamento e o controle da recorrência dos episódios, em lesões pouco extensas, podem ser exclusivamente tópicos empregando a nistatina suspensão oral ou outras opções como o clotrimazol comprimidos para dissolver na boca e o miconazol gel. Não havendo resposta adequada ou, na presença de lesões extensas, está indicado o tratamento sistêmico, que pode ser realizado com fluconazol, cetoconazol ou itraconazol. A anfotericina B, para uso endovenoso, está estritamente reservada aos casos graves, devido às freqüentes reações adversas (SCHECHTER, 2004 apud WINGETER, 2007).

2.2.1 *Candida albicans*

Leveduras do gênero *Candida* são normalmente isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo *Candida albicans* a espécie mais patogênica. É um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina. É uma espécie de fungo diplóide. Por ser um organismo que habita normalmente o corpo humano, culturas de sangue positivas são freqüentemente atribuídas à contaminação, o que pode levar a um atraso no diagnóstico de uma infecção por *Candida*. Imunossupressão, debilidade orgânica, entre outros fatores, podem tornar o fungo patogênico, resultando em uma grave infecção sistêmica (SAMARANAYAKE *et al.*, 2001; ANGIOLELLA *et al.*, 2008).

Esse fungo causa infecções na pele, cavidade oral e esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema vascular de humanos. As infecções ocorrem em hospedeiros imunocomprometidos, pacientes. Fatores como próteses, dieta, higiene oral inadequada, uso de medicação oral, radioterapia, xerostomia, fumo e desordens sistêmicas podem ser considerados predisponentes à candidíase oral. O aumento da prevalência de doenças disseminadas causadas por *Candida* spp. tem se restringido a pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas e quimioterápicas, com deficiências imunológicas (TOROSANTUCCI *et al.*, 2004; NETEA *et al.*, 2008).

A maioria das infecções por *Candida albicans* pode ser tratada em primeiro lugar combatendo-se as causas que influenciam na colonização e proliferação das células leveduriformes e associando a aplicação de nistatina ou clotrimazol, no caso da candidíase mucocutânea crônica ou de candidíase oral associada a imunossupressão, os agentes tópicos podem não ser eficazes. Podendo nestes casos serem administrados medicamentos com anfotericina B, cetoconazol, fluconazol ou a flucitosina. Entretanto esses medicamentos podem ser hepatotóxicos e ainda deprimir a hematopoese (NUCCI *et al.*, 2005; SPANAKIS *et al.*, 2006).

2.2.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) é uma bactéria que apresenta uma morfologia de cocobacilo gram-negativo, imóvel, não esporulado, anaeróbico facultativo, sacarolítico e é um importante agente etiológico das periodontites agressiva e crônica além de produzir infecções extra-bucais. Embora seja detectado com maior frequência nesses quadros, uma relevante proporção de indivíduos saudáveis também apresenta esta bactéria. O controle deste quadro patológico, em diversos casos, apresenta grandes dificuldades de resoluções terapêuticas devido à capacidade deste microrganismo de colonizar tanto os tecidos sub-epiteliais quanto o tecido duro da bolsa periodontal, necessitando freqüentemente do uso de antibióticos sistêmicos para solução dos casos (SOCRANSKY, 1999).

Anteriormente classificado como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, tem como principal habitat o biofilme presente no sulco gengival, sendo também isolado da placa supragengival, mucosa oral, língua, saliva e tonsilas palatinas de seres humanos. (FINE *et al.*, 2006).

A. actinomycetemcomitans é capaz de produzir uma leucotoxina termolábil ativa sobre neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T, produzindo degranulação destas células, com a subsequente desorganização do tecido e imunossupressão local. Promove aumento de adesão microbiana, evasão de fagocitose e retardo no reconhecimento pelo sistema imune, adesão a células epiteliais, inibição da proliferação fibroblástica, retardo no reparo tecidual, inibe a quimiotaxia e fagocitose em neutrófilos, inibe a síntese de radicais oxidantes pelos leucócitos, inibe a fusão de lisossomos contendo enzimas digestivas e radicais como o ânion superóxido (TSAI *et al.*, 1984).

Slots *et al.* (1982), estudaram a susceptibilidade de 57 cepas clínicas e 2 não-clínicas mediante a técnica de diluição em Agar, concluindo que a tetraciclina e a minociclina eram entre todos os antimicrobianos estudados, os mais adequados para o tratamento dessa bactéria, observaram ainda que 10% das cepas eram resistentes a ampicilina, eritromicina e penicilina G.

2.2.3 aPDT em doenças microbinais orais

De acordo com Rovaldi *et al.*, (2000), a terapia fotodinâmica historicamente tem sua utilização associada a meios de tratar tumores cancerosos. Entretanto, a partir de um período relativamente recente, tem sido usada para matar células bacterianas com o uso de um fotoabsorvedor, sendo um potencial auxiliar no tratamento das doenças microbianas orais humanas.

Oliveira *et al.* (2007), utilizaram os corantes eritrosina e rosa bengala associado ao LED azul ($\lambda = 440-460$ nm) para avaliar a ação da aPDT sobre culturas planctônicas de *Streptococcus*

mutans. Conclui-se que a fotossensibilização *in vitro* do rosa bengala e da eritrosina por Diodo Emissor de Luz (LED - light emitting diode) apresentou atividade antimicrobiana sobre todas as cepas de *S. mutans* estudadas.

O efeito da aPDT sobre patógenos cariogênicos *in vitro* e *in vivo*, utilizando um aparelho fotoativador de luz halógena foi avaliado por Gonçalves (2009). A associação do azul de metileno com a fonte de luz mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e os grupos teste e uma redução bacteriana acima de 95 % foi observada. Indicando assim que os aparelhos de luz halógena podem ser mais uma alternativa para a aPDT.

Baptista *et al.* (2010), desenvolveram lesões de cárie dentária em modelo animal para avaliar a redução microbiana através da terapia fotodinâmica associando como fotoabsorvedor o azul de metileno; LED de emissão vermelha (entre 610 e 670 nm). Os resultados obtidos sugerem que a terapia fotodinâmica antibacteriana foi efetiva na redução de microaerófilos totais; nos parâmetros testados. Além disso; o número de microrganismos após a terapia fotodinâmica permaneceu significativamente abaixo do controle por 10 dias após o tratamento.

No caso do tratamento periodontal, é feita a aplicação tópica (irrigação) do composto na bolsa periodontal e posteriormente irradiada por luz, conduzida normalmente utilizando-se cabo de fibra ótica (FIG. 2.12) (WILSON, 2004).

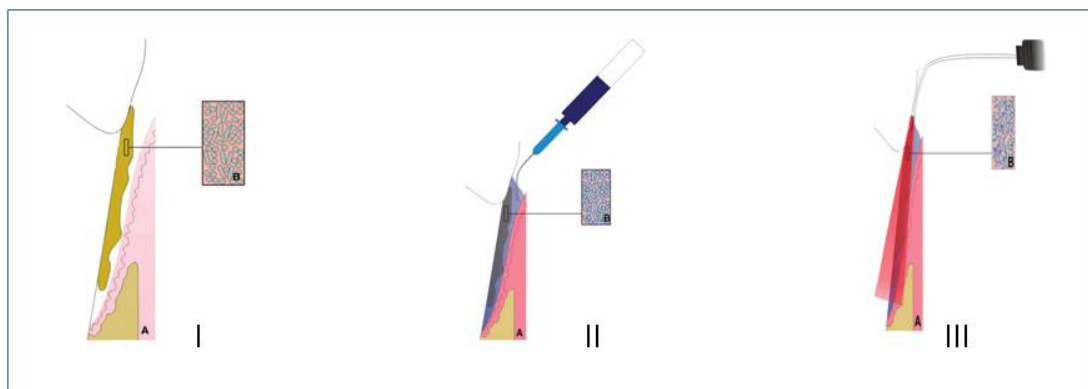


FIGURA 2.12 - Esquema representando as etapas da terapia fotodinâmica em bolsa periodontal

I) A - bolsa periodontal; B – biofilme subgengival

II) Aplicação do fotoabsorvedor

III) Irradiação com *laser* através da fibra ótica

FONTE - OLIVEIRA *et al.*, 2007. p.968-969

Prates *et al.* (2007), avaliaram a habilidade do verde malaquita a 0,01 % associado à irradiação *laser* em baixa intensidade (*laser* vermelho – 660 nm) em matar o *A. actinomycetemcomitans* em suspensão, bem como investigar por espectroscopia de absorção óptica, a degradação do verde de malaquita após a irradiação, e as alterações que ocorrem no sistema irradiado antes e após a terapia fotodinâmica. De acordo com os autores notou-se que o *laser* combinado com o corante nas doses de 5,4 e 9 J/cm², levou em ambas a redução significativa desse

periodontopatógeno, e também o corante é degradado após a irradiação, com formação de novos produtos na suspensão.

Em um estudo *in vitro*, utilizando-se a terapia fotodinâmica para inativação de bactérias periodontopatogênicas, Sousa (2007) avaliou e comparou a sensibilização letal das bactérias periodontopatogênicas (*Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*), através da utilização de lasers (660 nm) e LED (emitindo entre 620 e 630 nm), utilizando como fotoabsorvedor azul de O-toluidina (TBO) a 0,01%. Os resultados demonstraram uma redução percentual de 99,8% para o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, e um resultado não satisfatório de 49,5% para a *Prevotella intermedia*. Desta forma demonstrou-se que o corante azul de O-toluidina a 0,01% associado aos lasers e ao LED apresenta um excelente potencial para a utilização em aPDT em relação aos dois primeiros microrganismos. Foi observado também que não houve diferença estatística significativa do LED em relação ao laser de baixa intensidade. Mostrando assim que os LEDs podem ser uma nova e boa opção para a terapia fotodinâmica antimicrobiana .

Amorim (2007), avaliou o efeito do laser em baixa intensidade emitindo no vermelho do espectro eletromagnético com comprimento de onda de 660 nm, 100 mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos foi comparado com LED em baixa intensidade emitindo no vermelho com comprimento de onda de 630 nm, 100 mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos, associado ao fotoabsorvedor Azul de Toluidina com uma concentração de 25 µg/mL em uma amostra do fungo *Trichophyton rubrum*. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos 5 e 6 (PDT) com redução de 68,1% e 56% respectivamente, quanto ao número de colônias viáveis sendo que o LED por apresentar uma divergência maior que a luz laser, abrangeu um volume maior de suspensão do inóculo mostrando-se mais eficiente na sua ação fototóxica.

Soares (2008), estudou a susceptibilidade *in vitro* a inibição fotodinâmica (IFD) de isolados fúngicos de várias espécies (*Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Sporothrix* spp. e *Malassezia furfur*), utilizando como fotoabsorvedor o azul de orto-toluidina – TBO, e como fonte de luz um diodo de emissão de luz – LED, emitindo a 630 nm, que resultaram em maior redução da viabilidade celular para *Cryptococcus* spp e *Candida* spp. A autora conclui que a IFD constituiu alternativa eficiente para reduzir *in vitro* a viabilidade de células de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. Porém, as condições experimentais precisariam ser otimizadas para testes com *Sporothrix* spp. e *Malassezia furfur*.

Luan *et al.* (2009), investigaram se a fotossensibilização mediada por azul de toluidina e irradiação com laser (635 nm), exerce efeito prejudicial sobre os tecidos periodontais em ratos. Não foram observadas alterações inflamatórias ou necróticas na gengiva, dentina, polpa dentária ou osso alveolar dos ratos em nenhum dos grupos testados. Os resultados sugerem que aPDT é um

método seguro como coadjuvante para o tratamento antimicrobiano da doença periodontal sem efeitos nocivos para tecidos adjacentes normais.

O efeito letal da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre *Fusobacterium nucleatum* em pacientes com periodontite foi avaliado clínica e microbiologicamente por Sigusch *et al.* (2010). Neste estudo, a aPDT é realizada após raspagem e alisamento radicular em sessão única em pacientes com periodontite crônica localizada. Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: Índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica. Os resultados mostraram que os pacientes que receberam tratamento com aPDT, apresentaram reduções significativas no sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica médio. A concentração de DNA de *F. nucleatum* foi significativamente reduzido em relação ao grupo controle. Os autores concluem que os resultados deste estudo mostram que a aplicação da aPDT pode ser um método coadjuvante apropriado para reduzir a inflamação periodontal, bem como para tratar a infecção com *F. nucleatum*.

A inativação fotodinâmica (PDI) foi usada para inibir o crescimento *in vitro* e adesão de diversos isolados de *Candida* spp em células epiteliais bucais humanas, em um estudo realizado por Soares *et al.* (2008). Foi utilizado como corante o azul de O-toluidina (TBO) associado a irradiação de diodo emissor de luz (LED) vermelho. Foram obtidas redução média de 3,41 Log₁₀ no crescimento celular viável e média de 55 % na inibição da adesão células epiteliais bucais. Os resultados permitem concluir que a inativação fotodinâmica sob estas condições experimentais seria uma possível alternativa para inibir crescimento e adesão nas células epiteliais bucais da *Candida* spp.

A influência dos parâmetros de irradiação na terapia fotodinâmica em leveduras foi investigada por Prates *et al.* (2010). Para isso, suspensões de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* foram usadas. Duas taxas de fluência, 100 e 300 mW/cm² foram comparadas em 3, 6 e 9 min. de irradiação, que resultaram em fluências de 0 a 162 J/cm². A fonte de irradiação utilizada foi um laser emitindo em $\lambda = 660\text{nm}$ com potência ajustada em 30 e 90 mW. Azul de metileno na concentração de 100 μM foi utilizado como fotoabsorvedor. Como resultado, observou-se que a mesma fluência entregue em irradiações diferentes, gerou diferentes níveis de inativação fúngica. Além disso, maior taxa de fluência mostrou um aumento da inativação das leveduras. A aPDT foi efetiva e apresentou aproximadamente 6 logs de morte celular. Por outro lado, nem o fotoabsorvedor ou a irradiação separadamente promoveram morte celular. Em conclusão, o tempo de irradiação e intensidade tem um papel importante na eficiência da aPDT.

Soares *et al.* (2010) testaram *in vitro* a susceptibilidade de diferentes isolados de *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) aos efeitos fototóxicos da aPDT. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia do azul de toluidina O (TBO) a 25 μM e diodos emissores de luz (LED) com banda de

emissão principalmente localizada entre 610 e 630 nm e densidade de energia 54 J/cm^2 , contra as cepas de *C. gattii* com distintos perfil de suscetibilidade aos antifúngicos (anfotericina B: 0,015-1 $\mu\text{g/mL}$; itraconazol: 0,015-2 $\mu\text{g/mL}$; fluconazol: 4-64 $\mu\text{g/mL}$). Os fungos isolados apresentaram susceptibilidade variáveis a aPDT. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em relação ao peroxinitrito foi determinada, Após o irradiação observou-se que, alta quantidades de ROS/peroxinitrito e expressiva inibição do crescimento das cepas testadas . Os resultados indicam que a atividade fotodinâmica de TBO em combinação com a irradiação de diodo emissor de luz provoca uma redução significativa das condições sobre a viabilidade *C. gattii*, incluindo os isolados resistentes a os antifúngicos clássicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

1 – Equipamento de LED AZUL Twin Flex (MM Optics – São Carlos, Brasil), semicondutor de emissão de luz composto por diodo de InGaN, alimentação: AC:127~220 V/ 250 mW/ 50-60 Hz, registro na ANVISA/MS nº 80051420012, com banda de emissão em torno de 450 a 470 nm (FIG. 3.1).



FIGURA 3.1 – Equipamento de LED AZUL Twin Flex (MM Optics – São Carlos, Brasil).

2 – Espectrofotômetros: A) SHIMADZU UV-160 A / UV Visible Recording Spectrophotometer - (Shimadzu do Brasil S/A) (FIG. 3.2).



FIGURA 3.2 – Espectrofotômetro: UV-160 A Shimadzu – Japão

B) MICRONAL B542 (Micronal S/A-São Paulo-Brasil), com resolução de leitura de 1nm, na região espectral de 325 a 1000 nm, com faixa de medição fotométrica de 0~200 %T, e - 0,3~3 ABS. Exatidão fotométrica de $\pm 0,018$ ABS com filtros padrões. Lâmpada Halógena de 6 V x 10 W com frequência de 60 Hz e voltagem de 117 a 227 V (FIG. 3.3)



FIGURA 3.3 – Espectrofotômetro: B542 Micronal – São Paulo/BR

3 – Medidor de Potência (Power Meter) NOVA – Analogic Performance Report, Laser Power/Energy Monitor. Fabricante: Ophir Optronics – Science Based Industry Park, Jerusalém – Israel. (FIG. 3.4)



FIGURA 3.4 – Power Meter - NOVA – Ophir Optronics – Israel

4 – MICRORGANISMOS: Foram utilizadas uma amostra de referência de *Candida albicans* (ATCC 18804) e uma de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (FDC Y4), isoladas e pertencentes ao Laboratório de Interação Microrganismo/Hospedeiro e Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (FIG 3.5).



FIGURA 3.5 – Microrganismos utilizados no experimento (*Candida albicans* e *A. actinomycetemcomitans*).
 FONTE - www.doctorfungus.org (acesso em 12/04/2010)

5 – Fotossensibilizante: O fotoabsorvedor utilizado foi Curcumina em pó (Sigma (*Curcumin - from Curcuma longa (Turmeric)*), código C1386; Sigma-Aldrich do Brasil Ltda), em solução aquosas preparadas nas concentrações finais de 25, 50, 100 e 150 μ Molar (FIG. 3.6).

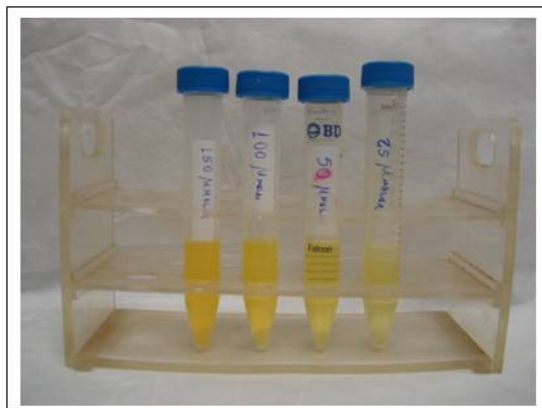


FIGURA 3.6 – Soluções de Curcumina nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 μ Molar. (Sigma-Aldrich do Brasil Ltda).

6 – Medidor de pH: pHmetro DIGMED Ltda modelo DM20 (FIG. 3.7).

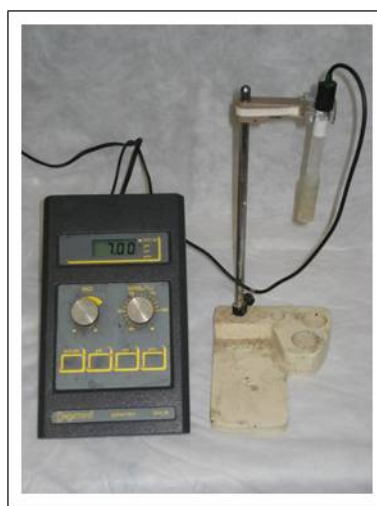


FIGURA 3.7 – pHmetro DIGMED

3.2 Métodos

A metodologia foi dividida em duas etapas. A primeira foi a preparação das soluções do fotoabsorvedor (Curcumina a 25, 50, 100 e 150 μ Molar) a serem utilizadas, verificando-se a absorção óptica e o pH dessas soluções. Nesta etapa, a potência do equipamento utilizado foi verificada. Durante a segunda etapa, foi realizado o procedimento laboratorial desde o crescimento dos microrganismos, passando pelas etapas de obtenção do inóculo na concentração desejada, irradiação, diluição, plaqueamento com posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs) viáveis e análise estatística dos dados obtidos.

3.2.1 Primeira etapa: Preparo das soluções

A Curcumina é um pigmento que devido sua estrutura química é praticamente insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido), e também é estável em soluções com pH menor que 8,0 e em temperaturas inferiores a 125°C.

Para preparar soluções aquosas, dissolveu-se Curcumina em pó em álcool etílico P.A, obtendo-se uma solução alcoólica saturada. Uma alíquota dessa solução foi diluída com água deionizada sucessivas vezes obtendo-se soluções de concentrações 150, 100, 50 e 25 μ Molar.

No início do experimento, as medidas do espectro de absorção das soluções foram realizadas, utilizando-se o espectrofotômetro Shimadzu UV-160 A (Shimadzu do Brasil S/A), obtendo-se medidas na amplitude entre 420 a 435 nm. Após o experimento as soluções foram armazenadas, protegidas de irradiação luminosa, seguido de uma nova leitura em 4 dias.

As medidas do pH das soluções, realizadas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), foram realizadas utilizando-se o pHmetro digital DIGMED DM20 (FIG 3.8).



FIGURA 3.8 Medidas do pH das soluções de curcumina.

A potência do aparelho emissor de luz (LED) utilizado foi aferida antes do procedimento pelo dispositivo Power Meter (Ophir Optronics – Israel) (FIG 3.9).

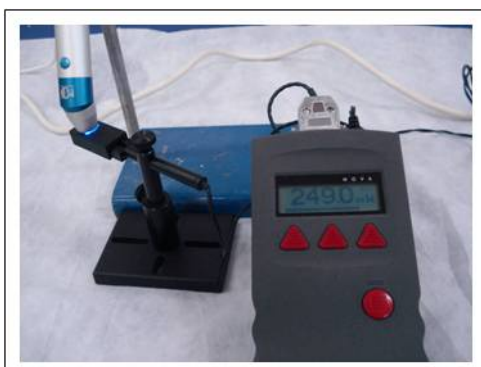


FIGURA 3.9 Medida da potência do LED.

3.2.2 Segunda etapa: Inativação fotodinâmica *in vitro*

Os diagramas apresentados nas FIG 3.10 e 3.11 ilustram resumidamente os passos da metodologia (detalhada a seguir) aplicada na segunda etapa do experimento.

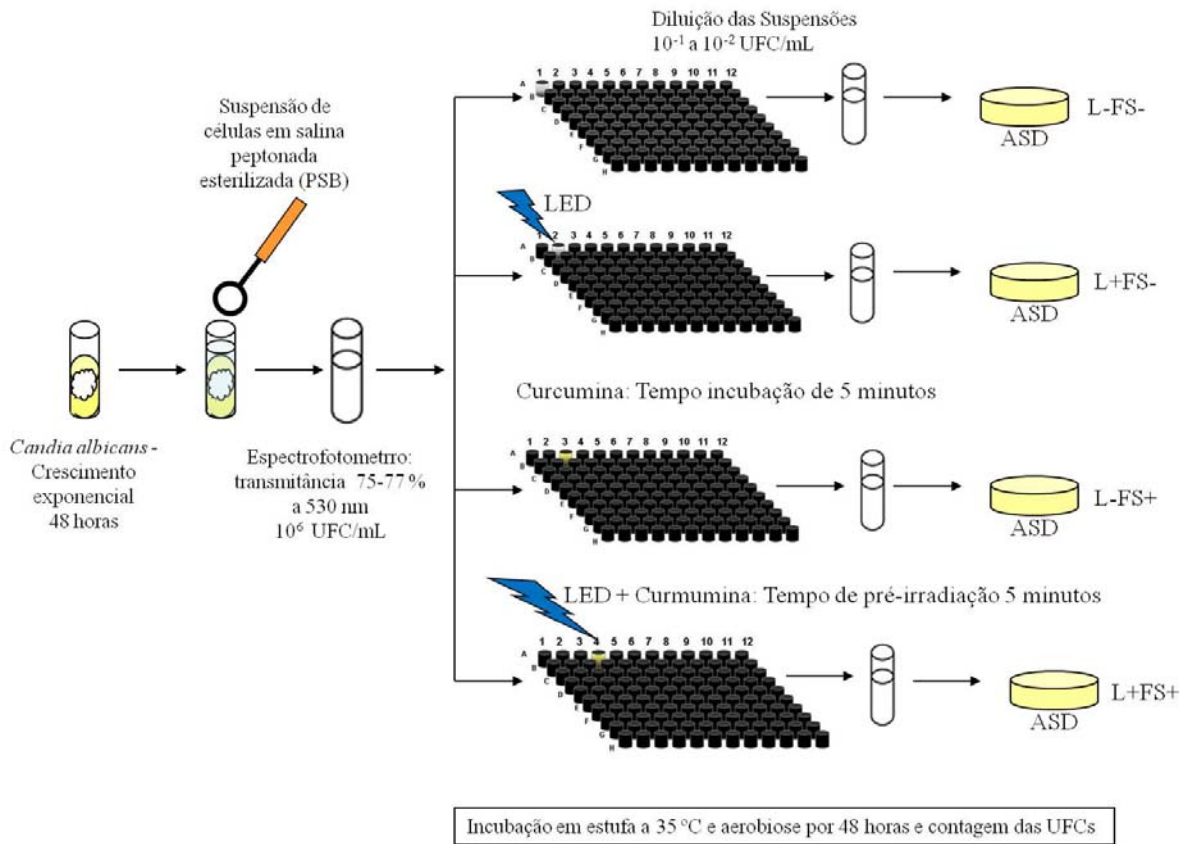


FIGURA 3.10 Diagrama da metodologia para *Candida albicans*.

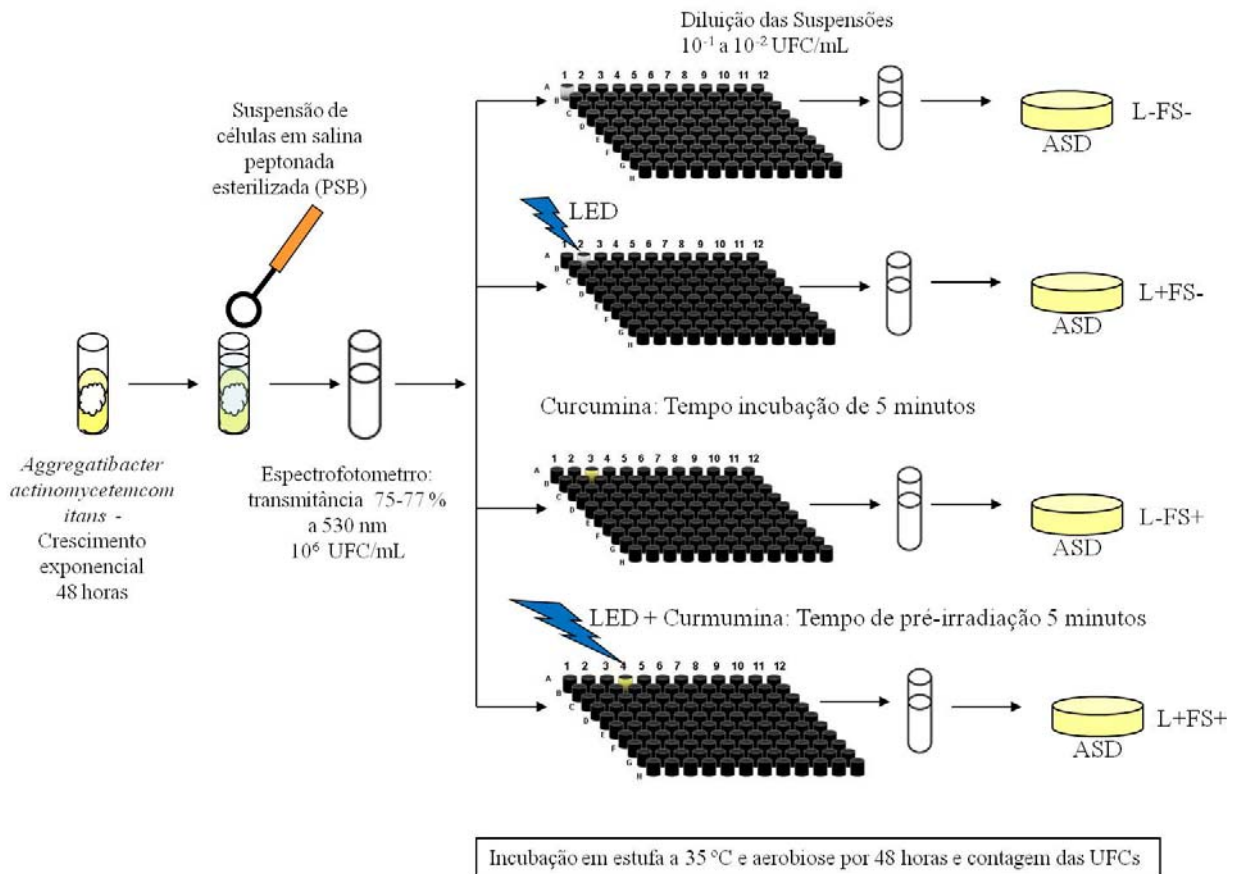


FIGURA 3.11 Diagrama da metodologia para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

1° PASSO

Preparo do inóculo da *Candida Albicans*: A amostra do fungo foi cultivada em ágar Sabourraud e incubada em aerobiose a 35 °C por 48 horas. Foram utilizados 5 mL de salina peptonada esterilizada (PBS) para preparar uma suspensão de células. Após homogeneização em vórtex, a concentração final do inóculo foi ajustada para 10⁶ UFC/mL, utilizando medidas no espectrofotômetro, com 75-77 % de transmitância a 530 nm (FIG. 3.12).



FIGURA 3.12 Medida da transmitância do inóculo

Preparo do inóculo do *A. actinomycetemcomitans*: A amostra bacteriana foi cultivada em ágar de Soja Tryptcaseina (TSA) e incubada em microaerofilia a 37 °C por 48 horas, para obter colônias em fase de crescimento exponencial. Uma massa de células foi recolhida assepticamente com alça esterilizada descartável e cultivada por 24 horas em caldo de soja triptcaseina (TSB). Após centrifugação, a massa bacteriana foi suspensa em PBS 1x esterilizada, sendo a absorbância da suspensão obtida utilizando-se espectrofotômetro para a densidade óptica de 1,05 (leitura a 560 nm) que correspondente a um inóculo de concentração final de $7,28 \times 10^8$ UFC/mL (FIG 3.13).



FIGURA 3.13 Sequência de preparo do inóculo de *A. actinomycetemcomitans*

2º PASSO

Teste da susceptibilidade à aPDT: Os inóculos foram aliquotados separadamente em placas opacas de microtitulação de 96 poços (OptiPlate -PerkinElmer, EUA), de acordo com os grupos presentes na TAB. 3.1 . A irradiação foi feita de cima para baixo pelo LED azul com banda de emissão entre $\lambda = 450$ a 470 nm, potência de 250 mW, por 6 minutos, que resultou na taxa de fluência de 500 mW/cm^2 e fluência de 180 J/cm^2 .

TABELA 3.1

Tabela dos grupos utilizados no primeiro experimento, sua descrição e simbologia utilizada

Grupos – Simbologia	Descrição do procedimento
Grupo 1 – G1 L-FS-	Inóculo – sem nenhum tratamento (controle)
Grupo 2 – G2 L+FS-	Microorganismo + luz (tempo = 6 min)
Grupo 3 – G3 L-FS+	Microorganismo + Curcumina 150 μ molar
Grupo 4 – G4 L-FS+	Microorganismo + Curcumina 100 μ molar
Grupo 5 – G5 L-FS+	Microorganismo + Curcumina 50 μ molar
Grupo 6 – G6 L-FS+	Microorganismo + Curcumina 25 μ molar
Grupo 7 – G7 L+FS+	Microorganismo + Curcumina 150 μ molar + Luz (tempo = 6 min)
Grupo 8 – G8 L+FS+	Microorganismo + Curcumina 100 μ molar + Luz (tempo = 6 min)
Grupo 9 – G9 L+FS+	Microorganismo + Curcumina 50 μ molar + Luz (tempo = 6 min)
Grupo 10 – G10 L+FS+	Microorganismo + Curcumina 25 μ molar + Luz (tempo = 6 min)

No grupo 1 (L-FS-), correspondente ao controle de crescimento do fungo, o inóculo não sofreu nenhum tratamento. No grupo dois (L+FS-), 0,02 mL do inóculo foram irradiados por 6 minutos pelo LED. Nos grupos três, quatro, cinco e seis (L-FS+), 0,2 mL de Curcumina nas concentrações de 150, 100, 50 e 25 μ molar respectivamente, foram adicionados a 0,18 mL do inóculo, sem a exposição às fontes de luz. Nos grupos sete, oito, nove e dez (L+FS+), 0,02 mL de Curcumina nas concentrações de 150, 100, 50 e 25 μ molar respectivamente, foram adicionados a 0,18 mL do inóculo e irradiados por 6 minutos pelo LED. Para os grupos sete, oito, nove e dez, foi estabelecido um período de pré-irradiação (PIT) de 5 minutos para absorção do fotossensibilizante. (FIG. 3.14).

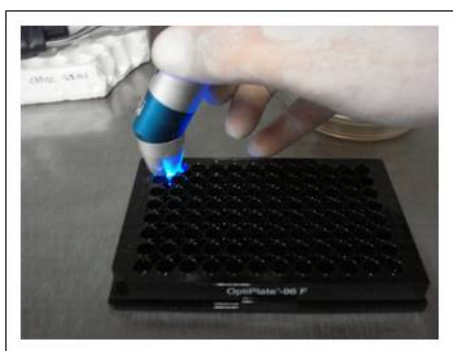


FIGURA 3.14 – Placa opaca com os grupos sendo irradiados pelo LED.

Foi realizado um segundo experimento apenas com *Candida albicans* no qual foram repetidos os mesmos passos, porém utilizando-se apenas as soluções de concentração 25 e 50 μMolar , e o tempo de irradiação pelo LED foi de 3 minutos, que resultou na taxa de fluência de 500 mW/cm^2 e fluência de 90 J/cm^2 , de acordo com os grupos presentes na TAB. (3.2).

TABELA 3.2 – Tabela dos grupos utilizados no experimento e sua descrição e simbologia utilizada

Grupos – Simbologia	Descrição do procedimento
Grupo 1 – G1 L-FS-	Inóculo – sem nenhum tratamento (controle)
Grupo 2 – G2 L+FS-	<i>Candida</i> + luz (tempo = 3 min)
Grupo 3 – G5 L-FS+	<i>Candida</i> + Curcumina 50 μmolar
Grupo 4 – G6 L-FS+	<i>Candida</i> + Curcumina 25 μmolar
Grupo 5 – G9 L+FS+	<i>Candida</i> + Curcumina 50 μmolar + Luz (tempo = 3 min)
Grupo 6 – G10 L+FS+	<i>Candida</i> + Curcumina 25 μmolar + Luz (tempo = 3 min)

3º PASSO

Diluição do inóculo: Diluições de 10^{-1} a 10^{-6} UFC/mL para *A. actinomycetemcomitans* e de 10^{-1} a 10^{-2} UFC/mL para *Candida albicans* das suspensões submetidas aos diferentes procedimentos foram realizadas em *ependorfs* contendo 0,9 mL de PBS 1x (FIG. 3.15).



FIGURA 3.15 – Diluições das suspensões em *Eppendorfs*.

4º PASSO

Plaqueamento: Posteriormente, o inóculo diluído de cada grupo foi semeado em placas de *Petri* contendo ágar TSA, utilizando alças de Drigalski (bastão de vidro), em duplicata. Todo o procedimento foi feito na câmara do fluxo laminar (FIG 3.16).



FIGURA 3.16 – Procedimento de sementeira do meio com os microorganismos na placa de *Petri*.

5º PASSO

Incubação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: As placas foram incubadas em jarra microaerófila a 37 °C por 48 horas e após este período realizadas a contagem das colônias bacterianas (FIG 3.17).



FIGURA 3.17 – Placas de *Petri* em jarra microaerófila e estufa a 37°C.

Incubação de *Candida albicans*: As placas foram incubadas em estufa a 35°C e aerobiose por 48 horas e após este período realizadas a contagem das colônias bacterianas (FIG.3.18).



FIGURA 3.18 – Estufa a 35°C para armazenagem das placas de *Petri*.

6° PASSO

Contagem das colônias: A contagem visual das UFCs (UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mL – número de unidades celulares com capacidade de reprodução por mL.), foi realizada utilizando-se uma caneta hidrográfica vermelha com as marcações feitas diretamente sobre a placa de *Petri* (FIG. 3.19).

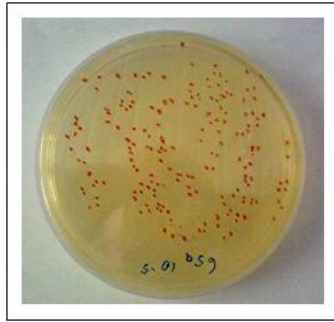


FIGURA 3.19 – Marcação na placa de *Petri* para contagem visual das UFCs.

Para garantir a reprodutibilidade dos dados, estes experimentos foram realizados em triplicata.

7° PASSO

Análise estatística: Os dados foram organizados e submetidos à análise estatística. Os resultados obtidos foram analisados por meio de métodos não-paramétricos, que não são números fracionados ou não apresentam distribuição normal (distribuição Gaussiana). Foram utilizados os testes de Friedman e Wilcoxon para comparar os resultados obtidos a partir dos experimentos, comparando os grupos de cada experimento entre si e aos pares, respectivamente (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das soluções

Alguns fatores foram levados em consideração na seleção da Curcumina para este trabalho experimental. Esse composto não apresenta toxicidade no escuro para o microrganismo testado, já que isoladamente, em contato com a suspensão fúngica não inibiu o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) como demonstrado nos resultados deste trabalho. Mostrou-se atóxica em uma série de estudos de cultura celular e em doses relativamente elevadas em humanos (DAHL *et al.*, 1989; AGGARWAL *et al.*, 2003; LAO *et al.*, 2006), e também por preencher um requisito essencial a terapia fotodinâmica que é possuir banda de absorção (420 a 435 nm) ressonante com o comprimento de onda da luz emitido pelo equipamento comumente utilizado nos consultórios odontológicos (450 a 470 nm).

A Curcumina é um pó insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido) (RUSIG *et al.*, 1992). Sendo o etanol e o DMSO substâncias relativamente tóxicas para o tecido vivo, optou-se por preparar soluções com concentração muito reduzida de etanol, como já descrito. Desta forma, as soluções utilizadas no experimento podem ser consideradas aquosas, deixando assim possibilidade de utilização futura *in vivo*.

Os espectros de absorção de soluções aquosas homogêneas de corantes apresentam características fortemente dependentes da concentração e essas variações são atribuídas à formação de agregados que são dímeros, trímeros ou polímeros. Este fenômeno pode ser observado nos espectros de absorção em solução aquosa (MOSER, 1998; NEUMANN *et al.*, 2000). O espectro de absorção da Curcumina varia em torno de 425 nm (TAKAHASHI, 1987). As medidas de absorção óptica das soluções iniciais observadas no presente trabalho, por meio da medição em espectrofotômetro, variaram entre 420 a 432 nm (FIG. 4.1). Esses resultados indicam que não houve nenhum processo de agregação do composto nas soluções utilizadas no experimento.

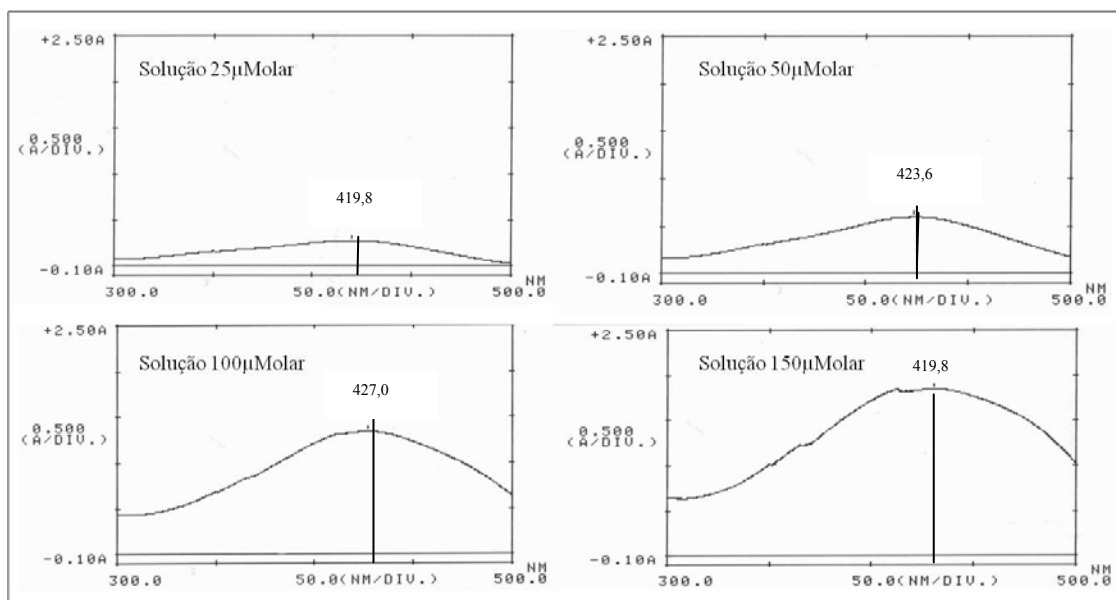


FIGURA 4.1 Medidas da absorção óptica inicial das soluções de curcumina.

Um processo adicional que a substância fotoabsorvedora sofre quando é irradiada é o de foto-branqueamento, causado por modificações na estrutura da molécula por reações paralelas nas quais a molécula apresentará modificações na sua estrutura, formando um composto que não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando, assim, de exercer sua ação terapêutica (STERNBERG *et al.*, 1998). Uma nova leitura de absorção óptica foi realizada 4 dias após o experimento. Na FIG. 4.2 encontram-se os gráficos obtidos destas medições. Os resultados indicam que apenas a solução a 150 μM , apresentou diferença na quantidade de energia absorvida, porém o pico de absorção foi semelhante. Esses dados sugerem que a curcumina não sofreu tal processo ou apresentou baixo rendimento na reação de foto-branqueamento no período analisado.

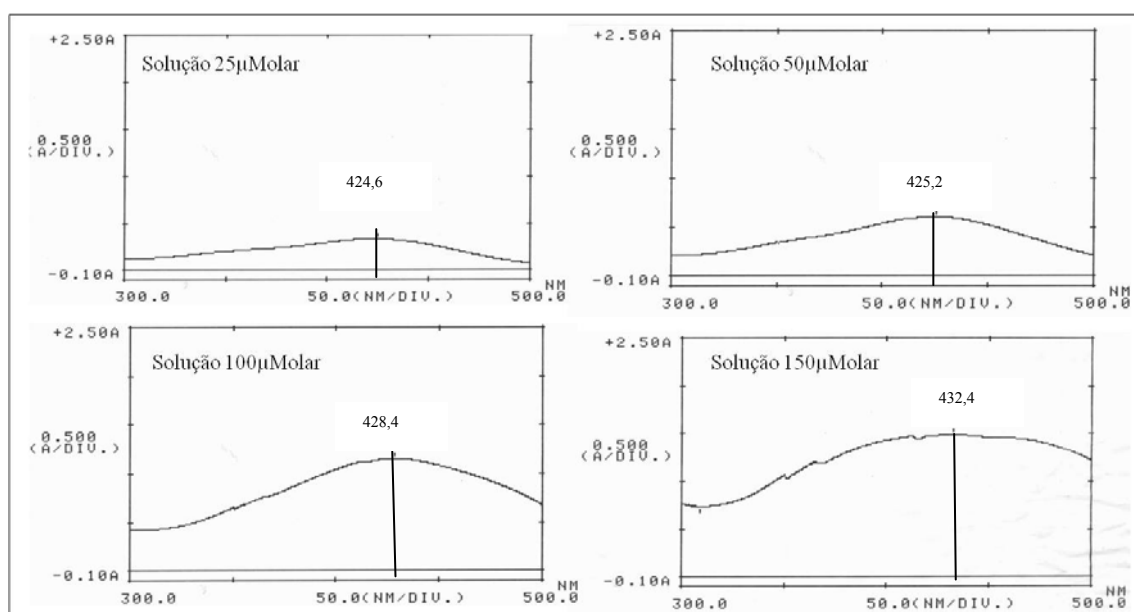


FIGURA 4.2 Medidas da absorção óptica final das soluções de curcumina.

A Curcumina é instável em pH maior que 8,0, segundo os trabalhos de Tonnensen *et al.* (1985), e comprovados pelos resultados semelhantes obtidos por Rusig *et al.* (1992), os quais constataram a faixa de pH entre 4 e 8 como a que proporcionou maior estabilidade à molécula e velocidade de degradação foi significativamente maior em pH superior a 8. No presente estudo, encontrou-se os seguintes resultados das medidas do pH para as soluções de Curcumina: Solução 25 μ Molar, pH 7.63; solução 50 μ Molar, pH 7.62; solução 100 μ Molar, pH 7.61 e solução 150 μ Molar, pH 6.8 (FIG. 4.3). Assim, pode-se afirmar que as soluções utilizadas no experimento encontram-se dentro da faixa de pH que proporciona maior estabilidade a molécula de Curcumina.



FIGURA 4.3 - Resultados das medidas do pH das soluções de Curcumina em diferentes concentrações.

A escolha pelo Diodo Emissor de Luz (LED) azul foi devida ao fato de que aparelhos similares são encontrados na maioria dos consultórios odontológicos, evitando assim um custo adicional para a realização da técnica. Este fator pode contribuir para maior adesão dos profissionais de odontologia a realização da aPDT como um coadjuvante no tratamento de várias infecções microbianas bucais. Outro quesito importante foi à proximidade da banda de emissão do aparelho (450 a 470 nm) com os picos de absorção das soluções de Curcumina (420 a 435 nm).

O LED devido as suas características citadas anteriormente, não apresenta pico de emissão e sim banda de emissão como mostrado no gráfico a seguir (FIG. 5.4), desta forma os picos de absorção das soluções de Curcumina não são coincidentes com os máximos de emissão do LED, mas encontram-se entre os limites da banda de emissão do aparelho.

No início de cada experimento foi verificada a potência transmitida pelo LED por meio do medidor de potência *Power Meter* (NOVA- Israel) (FIG. 4.4).



FIGURA 4.4 - Verificação da potência do LED utilizando medidor de potência POWER METER (NOVA- Israel)

As medidas foram tomadas durante o funcionamento do aparelho com intervalos de 01 minuto por um período de 10 minutos, de acordo com a tabela representada a seguir (FIG. 4.5).

Tempo (min)	Potência (mW)
1	249
2	251
3	250
4	249
5	250
6	252
7	247
8	249
9	248
10	250

FIGURA 4.5 – Medidas da potência do LED no intervalo de 10 minutos.

O desvio padrão é um parâmetro muito usado em estatística que indica o grau de variação de um conjunto de elementos. É uma medida de dispersão dos valores de uma distribuição normal em relação à sua média. O desvio padrão indica como os valores se comportam quando distantes da média, ou seja, seu grau de dispersão e sua probabilidade de acontecer a certa distância da média. Os valores encontrados para a média e o desvio padrão dos resultados do experimento foram respectivamente, 249,3 e 1,49.

O gráfico representado na FIG 4.6 mostra o comportamento dos valores obtidos para a potência do aparelho no processo de calibração.

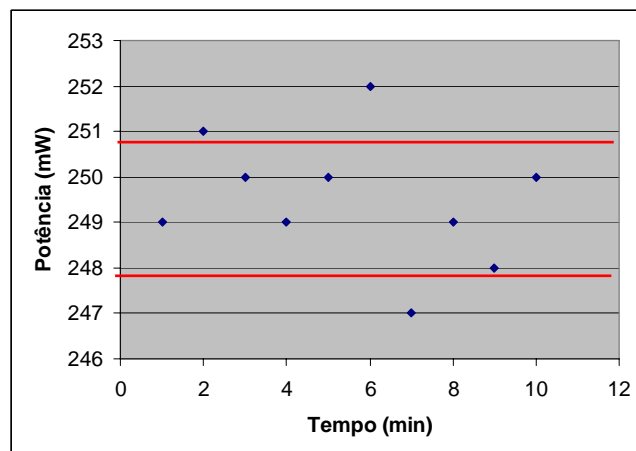


FIGURA 4.6 – Gráfico de dispersão dos valores obtidos na verificação da potência do LED.

Somando a média com mais um (+1) e menos um (-1) desvio, obtêm-se a primeira faixa de dispersão dos valores no gráfico, que se encontram entre as linhas vermelhas no gráfico. Com este resultado pode-se interpretar que a potência do equipamento, no geral, variaram entre $(249,3 + 1,49) = 250,79$ mW e $(249,3 - 1,49) = 247,81$ mW, ou seja, o desempenho demonstrou bastante regular, condizendo com o informado pelo fabricante (250 mW). Pode-se então estabelecer que o a banda principal de emissão do equipamento é de 249,3 ($\pm 1,49$) mW.

4.2 Procedimento *in vitro* para avaliação do LED associado à Curcumina com fotoabsorvedor

Experimento 1 - Procedimento *in vitro* para avaliação da fotossensibilização letal de *Candida albicans* e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pelo LED Azul, utilizando como fotoabsorvedor soluções de Curcumina a 25, 50, 100 e 150 μ Molar, tempo de irradiação de 6 minutos, potência de 250 mW, taxa de fluência de 500 mW/cm² e fluência de 180 J/cm².

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células viáveis ($p > 0,05$), presentes nos grupos: G 1- controle do fungo sem tratamento; G 2- Irradiação pelo LED por 6 minutos sem Curcumina; Exposição do fungo às soluções de Curcumina a 150 μ M (G 3), 100 μ M (G 4), 50 μ M (G 5) e 25 μ M (G 6), sem irradiação da luz. Desse modo, a luz emitida entre 450 a 470 nm ou o fotoabsorvedor, isoladamente, não produziram redução na viabilidade celular das células de *Candida albicans* e de *A. actinomycetemcomitans*. Com um intervalo de 95% de confiança, as células nas quais foram realizada aPDT (irradiação LED com Curcumina a 150 μ M (G 7), 100 μ M (G 8), 50 μ M (G 9) e 25 μ M (G 10)), porém, mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), quando comparados aos controles experimentais. A aPDT mostrou uma redução significativa no crescimento celular, houve a completa inativação dos microrganismos testados, não sendo observado nenhum crescimento de UFCs (TAB. 4.1 e 4.2, FIG. 4.7 e 4.8).

TABELA 4.1

Medidas descritivas da média, menor e maior valor em Log_{10} UFC/mL da redução do número de células viáveis de *Candida albicans* para cada grupo.

Grupos	Média	Menor valor	Maior valor
1	6,06	6,05	6,10
2	6,09	5,95	6,17
3	6,18	6,09	6,30
4	6,09	5,95	6,16
5	6,14	5,92	6,45
6	6,11	5,98	6,25
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *Candida albicans* (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm ($\pm 10\text{nm}$). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 150 μM (G 3), 100 μM (G 4), 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6), sem irradiação da luz; Irradiação LED com C (aPDT) a 150 μM (G 7), 100 μM (G 8), 50 μM (G 9) e 25 μM (G 10).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

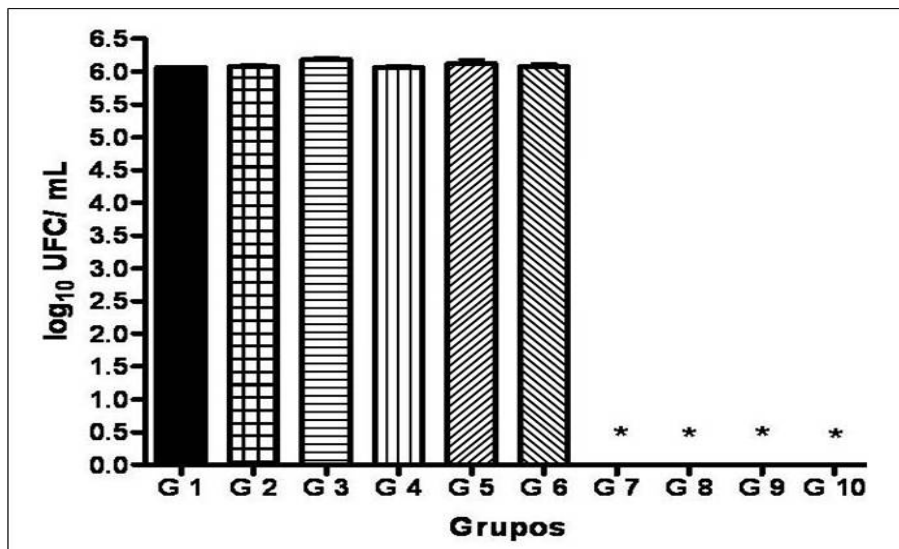


FIGURA 4.7 - Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *Candida albicans* (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm ($\pm 10\text{nm}$). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 150 μM (G 3), 100 μM (G 4), 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6), sem irradiação da luz; Irradiação LED com C (aPDT) a 150 μM (G 7), 100 μM (G 8), 50 μM (G 9) e 25 μM (G 10).

TABELA 4.2

Medidas descritivas da média, menor e maior valor em $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ da redução do número de células viáveis de *A. actinomycescomitans* para cada grupo.

Grupos	Média	Menor valor	Maior valor
1	8,85	8,80	8,87
2	8,47	8,30	8,74
3	8,60	8,45	8,69
4	8,49	8,47	8,50
5	8,76	8,63	8,96
6	8,78	8,59	8,99
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *A. actinomycescomitans* (FDCY4), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm ($\pm 10\text{nm}$). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 150 μM (G 3), 100 μM (G 4), 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6), sem irradiação da luz; Irradiação LED com C (aPDT) a 150 μM (G 7), 100 μM (G 8), 50 μM (G 9) e 25 μM (G 10).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

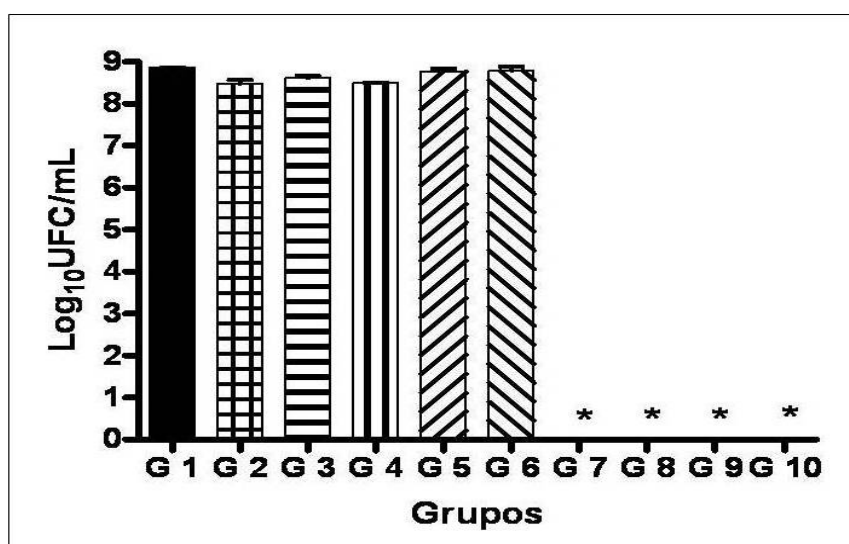


FIGURA 4.8 - Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *A. actinomycescomitans* (FDCY4), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm ($\pm 10\text{nm}$). G 1: controle da bactéria sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 6 minutos sem curcumina (C); Exposição da bactéria à C a 150 μM (G 3), 100 μM (G 4), 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6), sem irradiação da luz: curcumina. Irradiação LED com C (aPDT) a 150 μM (G 7), 100 μM (G 8), 50 μM (G 9) e 25 μM (G 10).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

Experimento 2 - Procedimento *in vitro* para avaliação da fotossensibilização letal de *Candida albicans* pelo LED Azul, utilizando como fotoabsorvedor soluções de Curcumina a 25 e

50 μM olar, tempo de irradiação de 3 minutos, potência de 250 mW, taxa de fluência de 500 mW/cm² e fluência de 90 J/cm².

Após análise estatística dos resultados, considerando 5 % de probabilidade de erro ($p = 0.05$), não foi verificada redução significativa do número de células viáveis presentes nos grupos: G 1- controle do fungo sem tratamento; G 2 - Irradiação pelo LED por 3 minutos sem Curcumina; Exposição do fungo à Curcumina a 50 μM (G 3) e 25 μM (G 4), sem irradiação da luz. Os dados obtidos mostraram que a luz ou fotoabsorvedores, isoladamente, não reduziram a viabilidade da amostra do microrganismo. As células nas quais foi realizado aPDT (Irradiação LED com Curcumina a 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6), mostraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), quando comparados aos controles experimentais. Os dados mostram que a associação de Curcumina e LED apresentou toxicidade as células de *Candida albicans* nos parâmetros de irradiação utilizados. Observou-se a eliminação completa dos microrganismos testados, não sendo observado nenhum crescimento de UFCs (TAB. 4.3, FIG. 4.9).

TABELA 4.3

Medidas descritivas da média, menor e maior valor em Log₁₀UFC/mL da redução do número de células viáveis de *Candida albicans* para cada grupo.

Grupos	Média	Menor valor	Maior valor
1	6,27	6,12	6,36
2	6,17	6,04	6,31
3	6,08	5,92	6,21
4	6,10	6,04	6,19
5	0	0	0
6	0	0	0

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *Candida albicans* (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm ($\pm 10\text{nm}$). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 3 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à 50 μM (G 3) e 25 μM (G 4), sem irradiação da luz; Irradiação LED com C (aPDT) 50 μM (G 5) e 25 μM (G 6).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

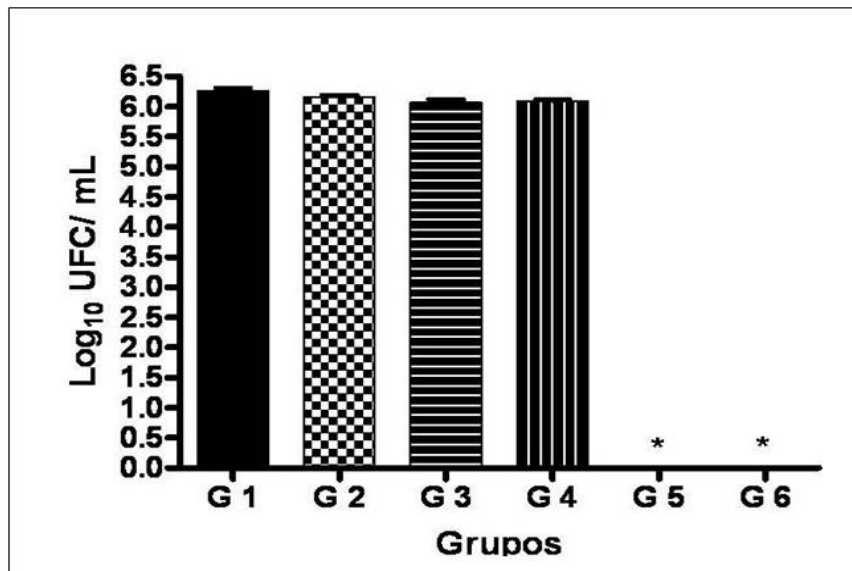


FIGURA 4.9 - Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em *Candida albicans* (ATCC 18804), utilizando curcumina (C) e Diodo emissor de luz (LED) emitindo a 460 nm (\pm 10nm). G 1: controle do fungo sem tratamento; G 2: Irradiação pelo LED por 3 minutos sem curcumina (C); Exposição do fungo à C a 50 μ M (G 3), 25 μ M (G 4), sem irradiação da luz. Irradiação LED com C (aPDT) a 50 μ M (G 5) e 25 μ M (G 6).

* – Valores estatisticamente significantes, considerando $p < 0.05$.

Nas FIGS. 4.10, 4.11 e 4.12, estão representadas imagens dos grupos nas placas de *Petri* após incubação para crescimento das UFCs nos experimentos com *Candida albicans* e com *A. actinomycetemcomitans*.

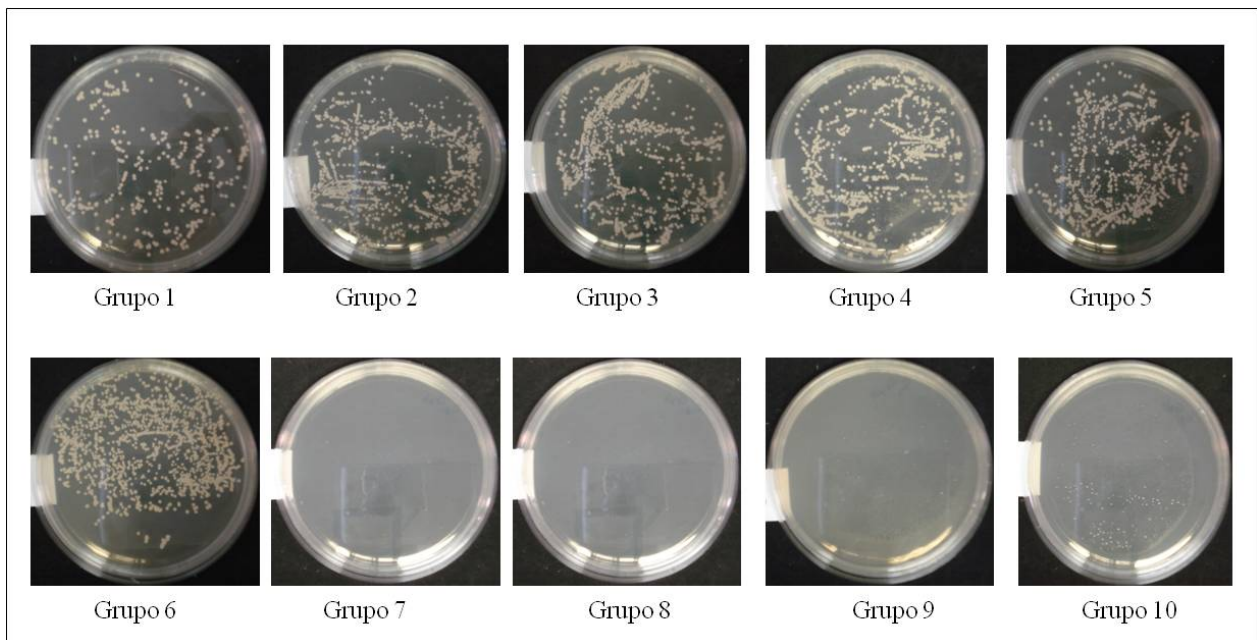


FIGURA 4.10 - Amostras de *Candida albicans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 6 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 7 a 10 não é observado crescimento de UFCs.

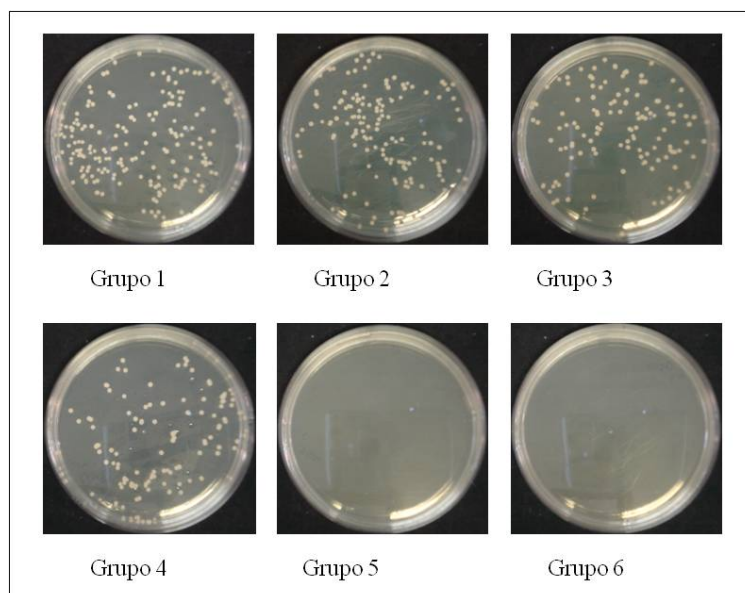


FIGURA 4.11 - Amostras de *Candida albicans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 4 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 5 e 6 não é observado crescimento de UFCs.

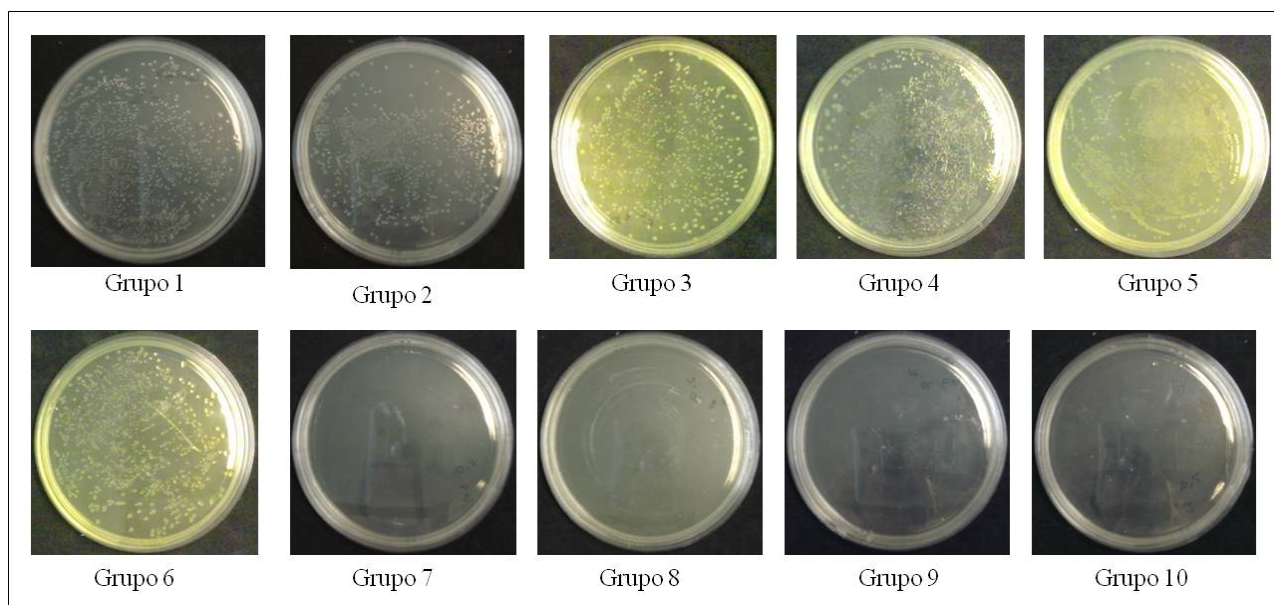


FIGURA 4.12 - Amostras de *A. actinomycetemcomitans* na placa de *Petri* nas quais pode ser observado nos grupos 1 a 6 o número de pontos correspondentes às colônias de fungos e nos grupos 7 a 10 não é observado crescimento de UFCs.

De acordo com os resultados observados nos dois experimentos representados nas FIG. 4.10, 4.11 e 4.12 pode-se notar a eliminação total dos microrganismos para os grupos aPDT quando comparados aos demais grupos. O grupo 1 (controle – inóculo), sem qualquer tratamento, apresentou ótimo crescimento dos microrganismos. Nos grupos em que não foi realizada a aPDT, não houve redução significativa da UFCs, mostrando que somente o corante e apenas a irradiação sem o corante não foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos de maneira satisfatória. No entanto, os grupos que foram irradiados associados ao corante pela técnica de aPDT com o tempo de 6 e 3 minutos, mostraram-se sensíveis à terapia proposta.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é um eficiente método de redução bacteriana e fúngica, sendo o seu uso bem indicado na prática clínica, visto que esta terapia se mostra eficiente em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microflora conhecida (WILSON, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana constitui uma alternativa de inibir “*in vitro*” o crescimento de *Candida albicans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, utilizando baixa concentração do fotoabsorvedor e pequena dose de energia irradiada. É necessária a realização de outros estudos, principalmente “*in vivo*”, para melhor adaptação da técnica às condições orgânicas dos pacientes. Esta técnica, aliada a um diagnóstico correto, pode ser um coadjuvante no tratamento de infecções orais causadas por esses microrganismos, sem os efeitos colaterais produzidos pelas drogas antimicrobianas e com maiores taxas de adesão ao tratamento pelos pacientes.

No presente estudo demonstrou-se que a utilização de um equipamento existente na maioria dos consultórios odontológicos associado a um composto de origem natural em baixas concentrações foi eficiente na fotossensibilização letal de dois microrganismos que participam como agentes etiológicos das infecções orais candidíase e periodontite. Este fato abre perspectivas para o planejamento de novas alternativas terapêuticas a serem utilizadas no controle dessas patologias, com as vantagens de não gerar um custo adicional para o profissional em relação a aquisição de um novo equipamento e também a utilização de uma substância natural de baixo custo e que não apresenta toxicidade na concentração utilizada.

Os trabalhos encontrados na literatura mostram a viabilidade de uso desta terapia, como auxiliar no tratamento de infecções na cavidade oral, por ser a aPDT uma terapia de baixo custo e, principalmente, com mínimos efeitos colaterais e sem efeitos sistêmicos, além de não ter sido relatado até o momento risco de provocar resistência bacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2007; LUAN *et al.*, 2009; SIGUSCH *et al.*, 2010)

Uma vantagem deste tratamento é sua ação local e restrita no tratamento, assegurando uma manutenção na ecologia entérica que, normalmente é muito afetada pelos antibióticos, e mesmo a microflora de vários sítios na área tratada também não é afetada pela administração local (WILSON *et al.*, 1996). Apesar de ainda não existirem estudos conclusivos sobre resistência bacteriana à ação da terapia fotodinâmica, só o fato dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo nos complexos sistemas bacterianos e fúngicos, pois o desenvolvimento de resistência as drogas convencionais pelos microrganismos representa uma importante causa de falha terapêutica (CHAN *et al.*, 2003).

Diversas fontes de luz (*lasers*, luz policromática e outras) foram utilizadas ao longo dos anos, usando-se principalmente comprimentos de onda no espectro visível e mais especificamente no vermelho associados a vários corantes, devido à boa penetração deste comprimento de onda nos

tecidos biológicos (KARU, 2003). Além disso, alguns trabalhos mostram que o tratamento com luz vermelha, ou azul, pode ser empregado como método terapêutico, para inativar determinadas bactérias periodontopatogênicas, que sintetizam porfirinas, cromóforos endógenos naturais, sem o uso de um fotoabsorvedor externo (HENRY *et al.*, 2000 e KONIG *et al.*, 2000). Portanto, a técnica (luz + fotoabsorvedor) pode ser proposta como potencial terapia, de baixo custo, para o tratamento e prevenção de doenças. O importante na terapia fotodinâmica é a capacidade de excitar o fotoabsorvedor em seu alvo com um mínimo efeito circunvizinho (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Um fator importante para o sucesso da reação fotodinâmica é a concentração do corante. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas a célula alvo, antes da ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). As concentrações utilizadas variam de acordo com as características químicas e da toxicidade do fotoabsorvedor (REYS, 2004). Concentrações mais elevadas de fotoabsorvedor podem produzir menores efeitos fototerapêuticos, pois os sítios de ligação do composto as células tornam-se saturados. Assim, não terão eficiência, os fótons formados a partir da excitação das moléculas do corante que não se ligaram a célula-alvo (JAKSON *et al.*, 1999). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a menor concentração de Curcumina utilizada (25 µM) apresentou excelente resultado na inativação fotodinâmica de *Candida albicans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seguindo os parâmetros selecionados, inativando completamente o crescimento dos microrganismos testados.

A constante busca por novos corantes, a definição de parâmetros ideais de irradiação, a otimização das concentrações dos fotoabsorvedores, só tende a ampliar ainda mais a eficiência e a aplicabilidade clínica da aPDT. Corantes menos tóxicos, com banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelos lasers/LEDs aumentariam a eficiência desta terapia, permitindo o combate a infecções cada vez mais profundas e sem a necessidade de múltiplas sessões de aplicação (GARCEZ *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana constitui uma alternativa de inibir “*in vitro*” o crescimento de *Candida albicans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, utilizando baixa concentração do fotoabsorvedor e pequena dose de energia irradiada. É necessária a realização de outros estudos, principalmente “*in vivo*”, para melhor adaptação da técnica às condições orgânicas dos pacientes. Esta técnica, aliada a um diagnóstico correto, pode ser um coadjuvante no tratamento de infecções orais causadas por esses microrganismos, sem os efeitos colaterais produzidos pelas drogas antimicrobianas e com maiores taxas de adesão ao tratamento pelos pacientes.

5 CONCLUSÕES

As soluções de Curcumina nas concentrações utilizadas no experimento apresentaram absorção óptica similar ao relatado na literatura, indicando, assim, que não ocorreu o processo de agregação molecular (dimerização ou polimerização) com essa substância em nenhuma das soluções testadas.

O pH obtido para as soluções apresentou valores fora da faixa preconizada como nociva para a estrutura da molécula de Curcumina.

A fluência de 180 J/cm^2 irradiada pelo LED associada à Curcumina mostrou-se eficaz na sensibilização letal dos microrganismos *Candida albicans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

A fluência de 90 J/cm^2 irradiada pelo LED associada à Curcumina mostrou-se eficaz na sensibilização letal do fungo *Candida albicans*.

As soluções aquosas de Curcumina, nas diferentes concentrações utilizadas ($150 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e $25 \mu\text{M}$), apresentaram igualmente eficácia na inativação dos microrganismos testados utilizando o LED azul na aPDT.

Seria de grande importância a realização de trabalhos futuros verificando a eficiência dos parâmetros utilizados neste trabalho, sobre outros microrganismos associados as diferentes infecções orais, e ainda, a obtenção de um LED que apresente banda de emissão mais estreita e mais próxima dos picos de absorção das soluções de Curcumina, podendo assim levar a uma melhoria nos resultados do experimento.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy consists of a promising technique to be used as an adjunct in the treatment of oral infections. The treatment is based on the topical administration of a photosensitizer that accumulates in the microbial cells, and the presence of light of appropriate wavelength and oxygen, promotes photochemical reactions producing chemical species that lead to awareness of the deadly microorganisms. Currently, in most dental offices are light emitting devices that may be of two types: those that use a light source a halogen lamp, and which employ light emitting diodes (LEDs) as a source of blue light. These devices are typically used for curing composite resins or accelerate the whitening process, and also used in photodynamic therapy in the inactivation of microorganisms, circled several naturally occurring in the oral cavity. Curcumin, known as turmeric (*Curcuma longa* L.) although not a native plant of Brazil is widely used by Brazilians in medicine is popular as a seasoning or as a food coloring. Curcumin, in specific concentrations, when irradiated by a few wavelengths, has a great effect on Gram positive phototoxic. In this work we analyzed the efficiency of equipment routinely found in dental offices, the blue LED ($\lambda = 450-470$ nm), coupled with a natural dye, Curcumin, through the study of in vitro susceptibility, the inhibition of photodynamic isolates of the fungus *Candida albicans* and the bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Aqueous solutions were prepared with low concentrations of curcumin, and checked the resonance between the dye and the light emitted by the equipment tested. The results showed that the blue LED associated with the parameters used have Curcumin efficiency in photodynamic inactivation of microorganisms analyzed (a reduction of 6 Log₁₀ CFU / mL), and thus can provide a basis for planning new alternative for the treatment of infections related to these agents.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, Curcumin, LED, Antimicrobial Photodynamic therapy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE Y. *et al.* Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*, 1999. 39: 41-47.

ACKROYD R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2001. Feb; v.74(5) p.656-69.

AGGARWAL *et al.*, 2003 Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.: Anticancer potencial of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2003. v.23 p. 363-398.

AGOSTINIS P. *et al.* Hypericin in cancer treatment: more light on the way *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2002. v.34 p. 221–241.

AMORIM, J. C. F. Ação fototóxica do laser em baixa intensidade e diodo de emissão de luz (LED) na viabilidade do fungo *Trichophyton rubrum*: estudo *in vitro*. Belo Horizonte: UFMG, 2007. [Tese de Doutorado] Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Minas Gerais, 2007.

ANGIOLELLA L. *et al.*, Increase of virulence and its phenotypic traits in drug resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2008. v. 52, p. 927-936.

ANTUNES V. “ESTUDO POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FOTODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO BRASILEIRO SOB LUZ SOLAR” [Dissertação de mestrado] Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade Estadual de Londrina/Pr -2001.

AKHMANOV S.A., CHERNIAEVA E.B. Photodynamic action of laser emission on biomolecules and cells. The mechanisms of photodynamic action at the molecular and cell levels. *Modern problems of laser physics*. 3^o ed. 1990.

ATVARS D.Z, MARTELLI C. Espectroscopia de Luminescência. Disponível em www.chemkeys.com; acessado em 20 setembro 2010.

AZUINE M.A. *et al.* Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr. Cancer*, 1992. v.17 p.77-83.

BAPTISTA A. *et al.* (2010), Photodynamic therapy on bacterial reduction in dental caries: in vivo study. *Proceedings Paper Vol. 7715*, 17 May 2010

BAPTISTA M. S., INDIG, G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. *Journal of Physical Chemistry B.*, 1998. v.102, p.4678-4688.

BORISSEVITCH I., SCHABERLE F.A. Fotoquimioterapia – Um novo método de tratamento de doenças graves. Princípios básicos. Disponível em: <<http://dfm.ffclrp.usp.br/fabio/fotoquimioterapia.htm>>. Acesso em 15 de agosto. 2010.

BRUGNERA Jr. A., *et al.* Laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003. p.78.

BUETTENER G.R., MANSON, R.P. Spin-Trapping Methods for Detecting Superoxide and Hydroxyl Free Radicals In Vitro and In Vivo. *Methods Enzymol*, 1990. v.186 p. 127–133.

BUNGE A.V. “Introdução à Quântica Química”, Ed. Edgard Blücher Ltda,1977.

CALLEGARI-JACQUES S. M. Bioestatística – Princípios e Aplicações. Ed. Artmed. 2003.

CHAN Y., LAI, C. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Laser in Medical Science*, 2003. v.18 p.51-55.

CHOW R.T. *et al.* The effect of 300 mW, 830 nm laser on chronic neck pain: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Pain*, 2006. v.124 p.201-10.

ÇALIS A. *et al.* Antimicrobial effect of natural dyes on some pathogenic bacteria *African Journal of Biotechnology*, 2009.Vol. 8 (2), p. 291-293.

SOARES B.M. *et al.* In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009. v.92 p.65–70.

DAHL T. A. *et al.*, Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol.*, 1989. v.151, p.183–185.

DARVEAU R. P. *et al.* The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology*, 1997. v.14, p.12-32.

DESROSIERS, M. Current Status of the EPR Method to Detect Irradiated Food. *Appl. Radiat. Isot.*, 1996. v. 47, n.11/12, p. 1621-1628.

DI MARIO F. *et al.* A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection: something to learn from failure? *Helicobacter*, 2007. v.12, p.238–243.

DOUGHERTY T.J. *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research*, 1978. v.38 p.2628-35.

ELLEPOLA A. N.; SAMARANAYAKE L. P. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *Arch Oral Biol.*, 1998. v. 43, p. 879-887.

FILGUEIRAS C. A. L.; *Química Nova na Escola*, 1996. n. 3, 22.

FINE D.H. *et al.*, 2006; How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases, Daniel H. Fine, Jeffrey B. Kaplan, *Periodontology*, 2006. v. 42(1), p. 114–157.

FRANCO E.B. *et al.* LED - uma nova tecnologia para fotopolimerização: avaliação com cimento ionomérico modificado por resina. *Jornal Brasileiro de Clinica Odontologica Integrada*, 2003. 7(38):116-118.

GANTA S. *et al.* Curcumin Enhances Oral Bioavailability and Anti-Tumor Therapeutic Efficacy of Paclitaxel upon Administration in Nanoemulsion Formulation
Published online in Wiley InterScience, 2010. (Disponível em www.interscience.wiley.com).

GARCEZ A.S. *et al.* Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. Rev. APCD, 2003. maio/jun; 57(3):223-26.

GARCEZ A.S. Laser em baixa intensidade associado a fotoabsorvedor para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2002.

GONÇALVES P.J. Estudos das características fotofísicas da porfirina meso- tetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

GONÇALVES P.V.A.J. Aplicação da terapia fotodinâmica na redução de patógenos cariogênicos. [Tese de doutorado] Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. Belo Horizonte, 2009.

GORMAN A.A., RODGERS M.A. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. Journal of Photochemistry and Photobiology, 1992. v.14 p.159-176.

GREENSTEIN, G. Advances in periodontal diseases diagnosis. Int. J. Periodonto. Rest. Dent., 1990. v.10, p.351-375.

GROSSWEINER L.I. *et al.* Type I and type II mechanisms in the photosensitized lysis of phosphatidylcholine liposomes by hematoporphyrin. Journal of Photochemistry and Photobiology B., 1982. v.36 p.159-167.

GUPTA K.K. *et al.* Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. FEBS Journal, 2006. v.273 p.5320–5332.

GUTKNECHT N, Eduardo C. P. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence, 2004. p.19-23.

HAAKE S.K. Microbiologia periodontal In: Carranza, F.A., Newman, M.G. Periodontia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997 p.87.

HAFFAJEE A.D., SOCRANSKY S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology, 2000. 1994 v.5 p.78-111.

HALLIDAY D. Fundamentos de Física. 4ªed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1993. v.2

HAMBLIN M. R.; DEMIDOVA, T. N.; *Antimicrob. Agents Chemother*, 2005. v.49, p.2329.

HAWKINS D. *et al.*, Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*, 2006. v.24 p.705-14.

HAYEK R.R.A. *et al.* Comparative Study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dog. *Journal of Periodontology*, 2005. v.76(8) p.1275-81.

HEELIS P. The photophysical and photochemical properties of flavins. *Chem. Soc Rev.*, 1982. v.11 p.15.

HEWITT P.G. Física Conceitual. Porto Alegre: Bookman; 2002 p.332, p.440-453.

JAKSON Z. *et al.* Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial Agent. *Lasers Med Sci*, 1999. v.14, p.150–157

HUANG Y.Y. *et al.* Biphasic Dose Response in Low Level Light therapy. *International Dose-Response Society*, 2009. v.7, n.4, p. 358 – 383.

HULTÉN L.M. *et al.* Harmful singlet oxygen can be helpful. *Free Rad Biol Med*. 1999, v. 27 (11/12), p. 1203-1207.

KAMUHABWA A. R. *et al.* Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 1999, 53, 110.

KANOPKA K., GOSLINSKI T. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research*. 2007. v.86(8) p.694-707.

KARU T. Low-Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. Fev. 2003. p.48-20.

KLESSINGER M., MICHL J. Excited states and photochemistry of organic molecules. New York: VCH Publishers, 1995. p.128.

LAO C.D. *et al.* Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2006. v.6, p.10.

LI-CHAN E. C. Y. A Aplicação da Espectroscopia Raman em Ciências; *Science and Technology*, Nov. 1996. V.7 p.361.

LEAL A.S. *et al.* Ressonância paramagnética eletrônica-RPE aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2004. vol.24, n.3, p. 427-430.

LINDHE J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. P. 115.

LITERAT A. *et al.* Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by Curcumin in hyaline membrane disease (HDM). *Life Sci.*, 2001. v.70 p.253-267.

LEWIS *et al.*, 1944, Lewis, G. N., Kasha. M. Phosphorescence and the Triplet State. *Journal of the American Chemical Society*. 1944 v.66, p.2100-16.

LUAN X.L. *et al.* Histological evaluation of the safety of toluidina blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci*, 2009. v.24 p.162–166.

MACHADO A.E. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 2000. v. 23 p.2

MAIA N.B. *et al.*, 1995; Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de cúrcuma. *SciELO Brasil*, 1995. 54(1):33-37.

MAILLET H. *O laser – Princípios e técnicas de aplicação*. São Paulo: Ed.Manole, 1987. p.1.

MANOHARAN S. *et al.* Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J*, 2009. 50(2):139.

MARTINS C. V. B *et al.* Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. v.63 p.337–339.

MEDEIROS I.S. Dispositivo LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outras fontes de luz. [Dissertação de Mestrado] *Ciência e Engenharia de Materiais – Universidade de São Paulo, São Carlos*, 2001.

MEISEL P. *et al.* Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2005. v.79 p159–170

MELLO, J.B., MELLO, G.P. *Laser em odontologia*. São Paulo: Santos, 2001. p.81-2.

MILLS R.W. *et al.* Dental composite depth of cure with halogen and blue light emitting diode technology. *Br Dent J.*, 1999. 186(8):388-91.

MOSER J.G. "Definition and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers" *Photodynamic tumor therapy 2nd and 3rd generation photosensitizers*. Clive Harwood Academy Publishers, 1998.v.2 p.3-6.

NETEA M. G *et al.* Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol. Med. Microb.*, 2008. v. 52, p. 118 – 123.

NEUMANN M.G. *et al.* Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa *Química Nova*, 2000. v.23 n.6

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. *Emerging Infections*, 2005. v. 41, p.521-526.

OCHSNER M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1997. v.39 p.1-18.

OLIVEIRA R.R. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy in the No-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study. *Journal of Periodontology*, 2007. v.78(6) p.965-973.

ORTH K. *et al.* Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000. v.57 (2) p.186-192.

ORTON J. W. *Electron Paramagnetic Resonance*. London; 1968.

PATHAK M. A., FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1992. v.14, p.3.

PERUSSI J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos *Química Nova*, 2007. Jul/Aug vol.30 n.4 .

PERVAIZ S., Reactive Oxygen-Dependent Production of Novel Photochemo-therapeutic Agents. *The FASEB Journal*, 2001. 15, 612-617.

PINHEIRO, M.V.B. *Introdução à técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)*. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

PIRES H. C. Comparação de dois sistemas de fotoativação de resinas compostas LED e lâmpada halógena: avaliação através de dureza em amostras de resina composta. [Dissertação de mestrado] Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru, 2005.

PRATES, R. A. Verde malaquita como fotoabsorvedor em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo in-vitro. São Paulo. IPEN, 2005. 37p. [Dissertação de Mestrado Profissionalizante em Laser em Odontologia] – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2005.

PRATES R.A *et al.* Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2007. v.86 p.70–76.

PRATES R.A. *et al.* (2010). Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica *Revista Brasileira de Física Médica*. 2010, v.4(1) p.53-7.

RAMSEWAK R.S. *et al.* Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, 2000. v.7 p.303-8.

RESHETNICKOV A.V. et al., 2000 Photosensitizer, and process Therefor. Proceedings of SPIE, 2000. 3909, 124.

RIBEIRO J.N. *et al.* Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclética Química*, 2007. v. 32(1) p.7-14

RIBEIRO M.S. *et al.* Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. Cap. 07; Livro Virtual; 25º CIOSP; São Paulo; 2005.

ROVALDI C.R. *et al.* Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against Oral Pathogens *In Vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. v.14(12) p.3364-67.

RUBY A.J. *et al.* Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters*, 1995. v.94(1) p.79-83.

RUSIG, O., MARTINS, M.C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, 1992. v. 1, n. 1, p. 158-164.

RUSSELL J.B. *Química Geral*. São Paulo: Makron Books; 1994 p.145, p.242-265.

SAMARANAYAKE Y.U., SAMARANAYAKE L.P. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* ,2001. Apr.; 14(2):398-429.

SARACENO A. J. *et al.* An Electron Paramagnetic Resonance Investigation of Vanadium in Petroleum Oils, *Anal. Chem.*, 1961. v. 33, p.500-501.

SCHAFER M. *et al.* Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. *Photochem Photobiol.*, 2000. v.71(5) p.514-23.

SCHECHTER M, RACHID M. *Manual de HIV/AIDS*. Revinter, Rio de Janeiro, 2004.

SCHITTINE K., FISCHER R.G. Avaliação clínica do efeito de um produto contendo clorexidina 0,12% e fluoreto de sódio a 0,05% no controle de placa supragengival e gengivite. *Plano Piloto. Periodontia*,1997. v.6 p. 8-11.

SCULLY C. *et al.* Candida and Oral Candidosis: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, 1994. v. 5, p. 125-157.

SEIF T.R. Cariología : prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental, *Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica*, 1997.

SIBATA C. H *et al.* Photodynamic Therapy: A New Concept in Medical Treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000. v.33(8) p.869-880.

SIGUSCH B.W. *et al.* Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in *Fusobacterium nucleatum*–Infected Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology*, 2010. v. 81 n.7 p.975-981.

SLOTS J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, 1982. v. 15(4) p.606-609.

SMIJS T.G *et al.* Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and microsporia with porphyrin photosensitizers. *Photochem. photobiol.*, 2004. Oxford, v.80, n.2, p.197-202.

Soares B.M. *et al.* *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation *Photochemistry and Photobiology*, 2010

SOCRANSKY S. S. *et al.* Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections, *Periodontology*, 1999.v. 20(1), p.341–362.

SOUKOS N. S. *et al.* Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003. v.33 p.161-168.

SOUSA G.R. Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo “in vitro”: [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais; 2007

SPANAKIS E. K *et al.* New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin. Infect. Dis.*, 2006. v. 43, 1060-1068.

STERNBERG E. D., DOLPHIN D., Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron*, 1998. v. 54, p.4151-4202.

STHAL F. *et al.* Light Emitting Diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials*, 2000. v.21 p.1379-85.

TAKAHASHI, M.Y. Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed. São Paulo: 1987.

TAVARES A. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs*, 2010. v.8 p. 91-105.

TONNESEN H.H., Karlsen J: Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1985. v.180, p.402-404.

TOROSANTUCCI A. *et al.* *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect. Immunity*, 2004. v. 72, p. 833-843.

TRIESSCHEIJN M. *et al.* Photodynamic Therapy in Oncology. *Oncologist*, 2006. 11, 1034-1044.

TSAI C.C. *et al.* Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infection Immunity*, 1984. v.43(2) p.700-705.

USUDA J. *et al.* Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, 2006. 1(5), 489-493.

VIEGAS C. JR. e BOLZANI V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 2006. v.29 n.2 São Paulo

WAINWRIGHT M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998. v.42 p.13-28.

_____. Pathogen Inactivation in Blood Products. *Current Medicinal Chemistry*, 2002. v.9(1) p.127.

WAINWRIGHT M. *et al.* Photoinactivation of viruses. *Photochemical and Photobiology Sciences*, 2004. v.3 p.406-411

WEISHAUPT K.R., *et al.* Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photodynamic inactivation of a murine tumor. *Cancer Research*, 1976. v.36 p.2326-29.

WILSON M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical and Photobiology Sciences*, 2004. v.3 p.412-418

WILSON, M., PRATTEN J. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to killing by low-power laser light. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1994. v.33 p.619-24.

WILSON M., *et al.* Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology*, 1992. v.25 p.77-81.

WILSON P.C. *Photosensitizing Compounds: their Chemistry, Biology and Clinical Use*. Wiley Interscience, 1989. v.1 p.73.

WINGETER M.A. *et al.* Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007. v.40(3) p.272-276

WOEHRLE D. Phtalocyanines and related macrocycles for multi-electron transfer in catalysis. *Polymers for Advanced Technologies*, 1995. v.6 p.118-130 ,

WOOD S. *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1999. v.50, p.1-7.

ANEXO A

A.1 Estrutura eletrônica dos átomos

De uma maneira simplificada, pode-se dizer que a matéria é constituída basicamente por átomos, que são estruturas subdivididas em duas regiões, núcleo maciço e eletrosfera (região em torno do núcleo) formada por nuvens de elétrons. Os principais constituintes do núcleo são os prótons e neutros, e na eletrosfera pode-se encontrar os elétrons em constante movimento. Estes estão distribuídos em regiões de energia constante, denominadas níveis de energia ou estados estacionários de energia. A energia dessas camadas aumenta à medida que se distancia do núcleo. Estas regiões apresentam variação de energia interna, denominadas subníveis de energia, e a distribuição dos elétrons na eletrosfera se dá em uma ordem crescente de energia. De acordo com a última teoria atômica (*teoria dos orbitais*), baseada na mecânica quântica, os elétrons são probabilisticamente localizados em regiões, nos níveis de energia, denominadas *orbitais*. Estas regiões são calculadas através da resolução de equações matemáticas para o elétron. A energia de cada um destes elétrons é definida por um conjunto de números, denominados *números quânticos*. Um dos números quânticos é denominado *spin*, que está relacionado com o momento angular orbital e o movimento orbital do elétron, mas de uma maneira muito simplificada, pode-se dizer que indica o sentido de rotação do elétron (horário ou anti-horário), e de acordo com o Princípio da Exclusão de Pauli, em um átomo, não pode haver dois elétrons com todos os números quânticos iguais, ou ainda, em um mesmo orbital pode haver no máximo dois elétrons, desde que apresentem spins contrários. De maneira esquemática, os elétrons são representados por setas opostas para simbolizar o sentido de rotação (\uparrow ou \downarrow). Os níveis e subníveis de energia presentes no átomo podem ser representados de maneira esquemática, em ordem crescente de energia, através de um diagrama de energia, mostrado na figura A.1 (RUSSELL, 1994).

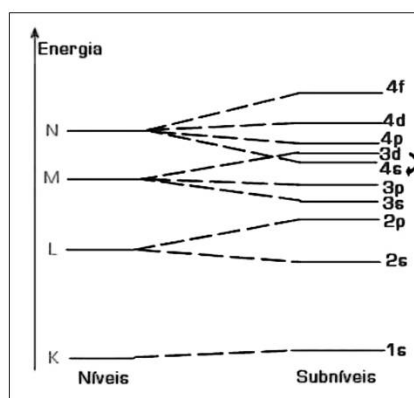


FIGURA A.1 – Diagrama de energia para os níveis e subníveis.
 FONTE - RUSSEL, 1994. p. 145 (modificado)

Dois ou mais átomos, iguais ou não, podem formar uma ligação estável, constituindo assim uma molécula, na qual os elétrons serão descritos por uma configuração semelhante à dos átomos. Essa interação dos átomos, e mesmo a das moléculas com suas vizinhas, modifica os níveis energéticos individuais. Para os gases, devido a sua pouca densidade, a interação é desprezível, e os níveis de energia não sofrem grandes alterações em relação aos átomos ou moléculas isolados, mantendo a estrutura fina do espectro de níveis. Porém, em um meio mais condensado, como os líquidos ou sólidos, os átomos estão muito próximos, e as interações são muito intensas, assim, a estrutura fina do espectro praticamente desaparece, os níveis de energia alargam-se, tornando-se *bandas de energia* (MAILLET, 1987).

Fótons são conceitualizados de uma maneira simplificada, como unidades de luz. A energia transportada por um fóton é determinada pela equação: $E = hf$, onde f é a frequência da radiação eletromagnética (unidade: Hertz - Hz) associada ao fóton, e h é a constante de Planck (aproximadamente $6,62 \cdot 10^{-34}$ J/s). Quando um fluxo de fótons incide na matéria, suas moléculas podem absorver essa energia e fazer com que seus elétrons transitem do *estado fundamental* (quando sua energia é mínima; E_0 no diagrama da FIG. A.2), para níveis eletrônicos mais externos (mais energéticos). Nessa forma, o átomo ou molécula, agora mais energético, encontra-se então no *estado excitado* (estado instável; E_1 no diagrama da FIG. A.2). A transição pode acontecer entre diferentes estados eletrônicos da molécula produzindo em geral uma transição eletrônica. Após a absorção da radiação, a molécula se encontra em um estado com excesso de energia e se ela não sofrer nenhuma reação ou “degradação”, irá naturalmente encontrar alguma forma de perder esta energia e retornar ao estado fundamental. Os processos de perda de energia entre dois estados eletrônicos podem ser radiativos ou não radiativos. Os radiativos consistem na relaxação por emissão de radiação e são denominados de fluorescência (extremamente rápida: 10^{-15} a 10^{-13} segundos) e fosforescência (mais lenta; podendo durar horas). Os processos não radiativos que ocorrem entre estados eletrônicos de mesmo spin, $S_2 \rightarrow S_1$, são chamados de conversão interna

(*internal conversion*), aqueles que ocorrem entre os estados do spin diferente $S_1 \rightarrow T_1$, são denominados de cruzamento intersistemas (*intersystem crossing*). Essa transição pode ainda ocorrer dentro do mesmo nível de energia, entre os subníveis. Existe uma relação matemática entre a variação de energia ($\Delta E = E' - E$) e a frequência do fóton de luz emitido, que é, $\Delta E = hf$ (MAILLET, 1987; GONÇALVES, 2006).

No fenômeno da fluorescência, quando um fóton excita o átomo, os elétrons passam através de vários níveis intermediários de energia. Assim, ao relaxar, o elétron pode realizar vários saltos menores, nível a nível, emitindo fótons com energias menores. Na fosforescência, átomos ou moléculas ao serem excitados permanecem por um período de tempo mais prolongado nesse estado. Com resultado, existe um tempo de retardo entre o processo de excitação e o de relaxação, fazendo com que a espécie permaneça em um estado metaestável (estado prolongado de excitação), sofrendo relaxação gradual. Se a fonte da excitação for removida, será observada a emissão de fótons por um determinado tempo. Devido a esses fatores, o fenômeno da fosforescência ocorre geralmente, de maneira mais lenta que a fluorescência (HEWITT, 2002).

De uma maneira bastante simplificada a transição de um elétron entre níveis eletrônicos de energia em um átomo ou molécula isolados, ao absorver e ao emitir energia, está representada na figura 2.2.

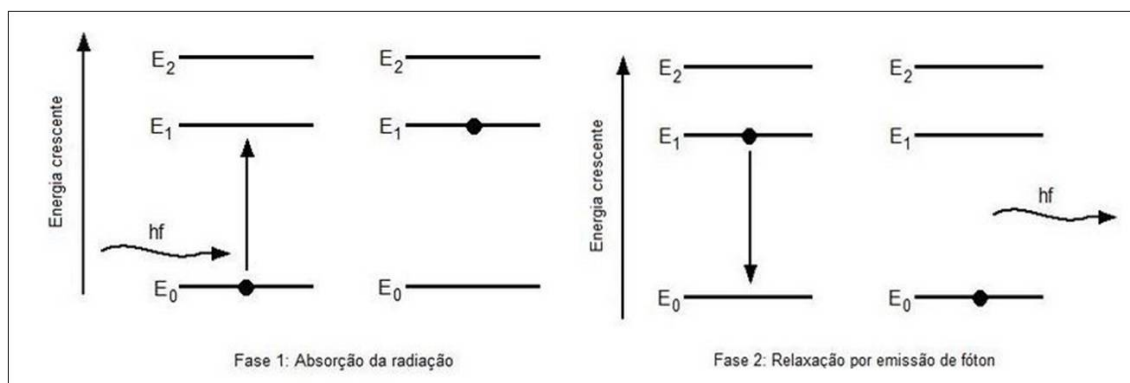


FIGURA A.2 – Diagrama de energia para transição eletrônica.

FONTE - <http://legauss.blogspot.com/2009/04/bbe.html> (acesso em 25/04/2010)

Na década de 40, o físico Alexander Jablonski, baseando-se em um diagrama de energia de estados eletrônicos, elaborou uma maneira de tratar dos processos de absorção e relaxação de uma molécula. Relaxação é um termo também utilizado para a transição de elétrons para níveis ou subníveis menos energéticos. Nesse modelo, o cientista atribui a presença de um estado metaestável, que mais tarde veio a ser reconhecido como um estado tripleto (LEWIS *et al*, 1944).

Em um orbital, os elétrons podem apresentar valores para o número quântico spin iguais à $-1/2$ ou $+1/2$ dependendo do seu sentido de rotação. Dessa forma, os termos singlete e tripleto se justificam pela multiplicidade destes níveis. Em um estado singlete a soma dos spins de todos os elétrons da molécula (spin total) é nulo, spins antiparalelos, enquanto que em um estado tripleto encontram-se dois elétrons com os spins paralelos e a soma dos spins apresentará uma resultante (FIG. A.3). O estado singlete é necessariamente, uma forma excitada da espécie química, porém o estado tripleto pode ser encontrado também em espécies no estado fundamental, como é o caso do oxigênio. A maioria dos compostos de interesse biológico é diamagnética, ou seja, não possui elétrons desemparelhados, mas segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados (paramagnéticos), nos orbitais moleculares degenerados (orbitais diferentes, mas com a mesma energia). Por esta razão o estado fundamental do oxigênio molecular é tripleto (KLESSINGER e MICHL, 1995; STERNBERG et al, 1998).

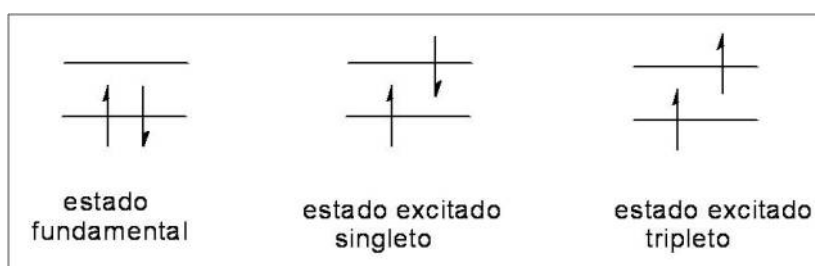


FIGURA A.3 – Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto.

FONTE - www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br (acesso em 01/09/2009)

A forma atual do diagrama de Jablonski (FIG A.4) representa o estado fundamental de uma molécula e seus estados excitados singlete e tripleto.

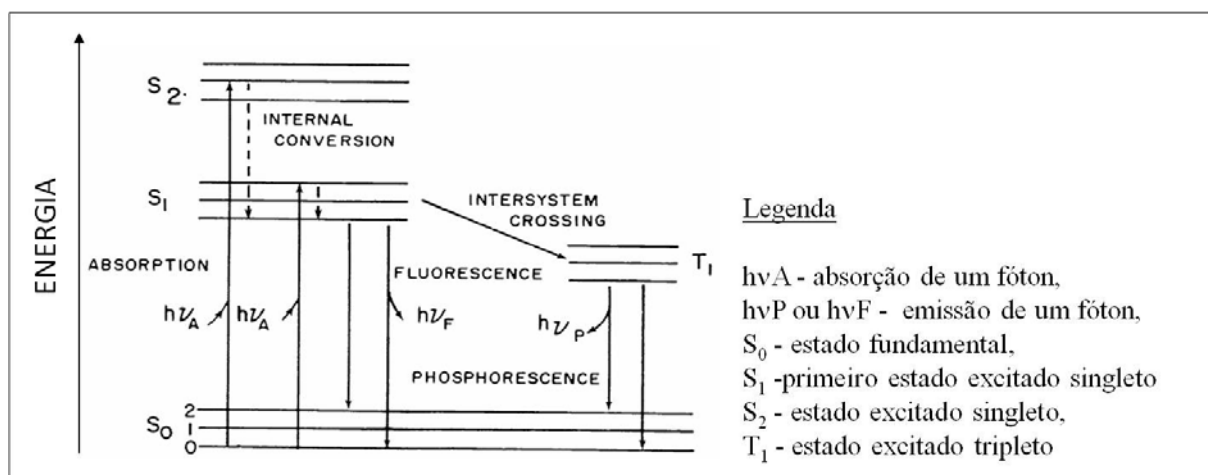


FIGURA A.4 - Diagrama de Jablonski.

FONTE - www.dqb.fc.ul.pt (acesso em 01/05/2010)

A emissão de radiação eletromagnética proveniente de moléculas que foram excitadas retornando ao seu estado fundamental é denominada *luminescência molecular*. Essa é dividida, como já referido acima, em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, tem-se a fluorescência. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida, estado tripleto. Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população de elétrons que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental ocorre muito rapidamente (tempo de vida na ordem de nanossegundos). Outro parâmetro importante é a eficiência de uma amostra emitir fluorescência, também denominado por rendimento quântico da fluorescência. Esse rendimento é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos pelo material (ATVARS *et al*, 2002).

A.2 Luz e Espectro eletromagnético

A luz é uma radiação que se propaga na forma de onda eletromagnética que transporta energia. A classificação das ondas eletromagnéticas baseia-se na sua frequência, ou comprimento de onda, o que constitui o espectro eletromagnético. A luz visível é uma pequena parte do espectro eletromagnético que compreende os comprimentos de onda na faixa aproximada entre 400 nm a 700 nm (FIG. A.5). A frequência é a taxa de repetição de uma determinada vibração, ou seja, número de cristas sucessivas que passam por um ponto. Geralmente a frequência de uma onda é medida em número de ondas por segundo ou Hertz (Hz) e representado pela letra grega ν . O comprimento de onda, simbolizado pela letra grega λ , é a distância que vai de uma crista a outra vizinha, sendo normalmente medido em nanômetros (nm). Um nanometro equivale a $1,0 \times 10^{-9}$ metros, ou um milionésimo de milímetro. A amplitude da onda é a meia distância entre a crista e a depressão e representa a posição de equilíbrio da onda. Na figura A.6 está representada uma parte de uma onda. (HALLIDAY, 1993).

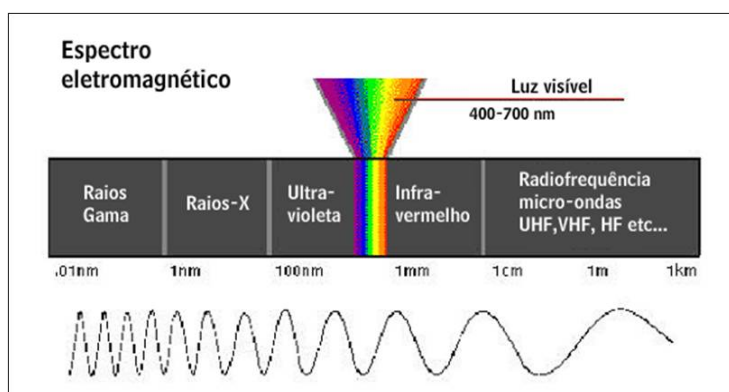


FIGURA A.5 – Espectro eletromagnético da luz.
FONTE - www.inape.org.br (acesso em 12/07/2009)

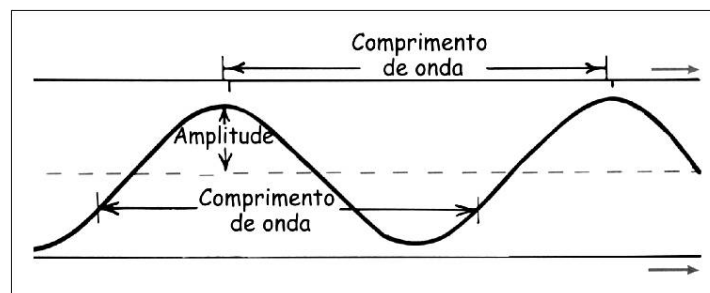


FIGURA A.6 – Onda eletromagnética
 FONTE: HEWITT, 2002. p. 332.

Analisado o desenho da onda, pode-se chegar à conclusão de que a frequência e o comprimento de onda são inversamente proporcionais, ou seja, quanto menor o comprimento de onda, maior será o número de cristas consecutivas que passam por um ponto em um segundo. Quando a luz é transmitida através da matéria, alguns dos elétrons dos átomos são forçados a oscilar. Dessa forma, a maneira como um material responde à incidência de luz depende da frequência da própria luz e da frequência natural dos elétrons no material. Quando a frequência da luz absorvida pelo material e a vibração dos elétrons do mesmo encontram-se com valores próximos ou iguais, é dito que há ressonância entre o material e a luz, ou seja, o material absorverá melhor luz de comprimento de onda (ou frequência) nos valores ressonantes com a de seus elétrons. Por isso, materiais diferentes apresentam picos de absorção de luz, em faixas diferentes do espectro. No início do século XX, o físico Max Planck, formulou a *teoria dos quanta*, na qual admitia que os corpos aquecidos emitem radiação não sob a forma de ondas, mas sob a forma de pequenos “pacotes” de energia denominados *quantum*, ou seja, a energia é descontínua. O cientista propôs que cada quantum equivalia a uma quantidade definida de energia, proporcional à frequência da radiação. Atualmente, um *quantum* (plural: *quanta*) de energia radiante é denominado *fóton* (HEWITT, 2002).

A.3 Espectroscopia

Espectroscopia pode ser definida como sendo o estudo de espectros, que são, o resultado obtido quando as radiações eletromagnéticas são emitidas nos seus comprimentos de onda ou frequências correspondentes. O estudo da interação da radiação com a matéria é uma das formas mais eficazes de se obter informações sobre propriedades microscópicas de sólidos, líquidos e gases. A utilização de técnicas espectroscópicas na caracterização de substâncias está baseada no fato dos níveis de energia dos átomos e moléculas funcionarem como sua impressão digital. Logo, a

observação (determinação dos comprimentos de onda) das raias de emissão e absorção de luz por uma dada substância serve para identificar de maneira inequívoca a composição da mesma (FILGUEIRAS, 1996).

Os primeiros cientistas a descobrirem este fato foram Gustav Robert Kirchhoff e Robert Wilhelm Bunsen, em 1859. Esses autores desenvolveram um espectroscópio baseado em um prisma, o qual ainda é utilizado para análises químicas. O espectroscópio desenvolvido por estes cientistas consiste em um sistema de lentes colocado próximo a um prisma. O espectro luminoso passa por uma fenda e atinge o sistema de lentes colimadoras. Estas lentes concentram a luz tornando seus raios paralelos. Ao saírem das lentes, os raios luminosos incidem sobre o prisma, aonde são finalmente separados em suas cores componentes. Através de uma lente ocular, um observador pode focalizar a imagem e ver as cores componentes do elemento. A FIG. A.7 2 ilustra um espectroscópio moderno, baseado no desenvolvido por Kirchhoff e Bunsen.



FIGURA A.7 Espectroscópio de bancada
FONTE: www.jroma.pt/images/goniometro.jpg
(acesso em 08/03/2010)

Diferentes elementos absorvem e emitem luz de forma característica, e a análise espectral permite diferenciá-los. Cada cor de luz corresponde a um determinado comprimento de onda e uma frequência distinta. A frequência de luz emitida ou absorvida por um determinado átomo ou molécula depende criticamente de sua estrutura e dos possíveis movimentos de suas partículas constituintes. Os espectrofotômetros (FIG. A.8) modernos são instrumentos de análise que permitem selecionar o comprimento de onda (λ) da radiação adequado à análise de um determinado componente; medir a intensidade do feixe emergente que corresponde a um determinado feixe incidente, convertendo o sinal recebido no detector em medida de absorvância para o comprimento de onda da análise. Em outras palavras, criar o "Branco" e em seguida fazer as medidas com a amostra, determinar a concentração de uma espécie em solução a partir do gráfico da variação de absorvância (ou transmitância) em função da concentração de várias soluções-padrão. A precisão dos comprimentos de onda para análise são chamados de bandas de passagem, mais comum na ordem de 10 nm. O espectro da análise mais comum é de 330 nm a 1100 nm para a faixa visível. No espectrofotômetro a ocular é substituída por uma câmera e é usado para medir a

intensidade da luz em comparação com a de uma luz procedente de uma fonte padrão. Essa comparação permite determinar a concentração da substância que produz esse espectro. A luz é emitida e absorvida em unidades minúsculas ou corpúsculos chamados fótons ou quanta. O átomo emite ou absorve um quanta de luz de uma cor determinada quando um dos seus elétrons salta de uma órbita para outra. A emissão e a absorção de luz por parte de uma molécula correspondem a seus diferentes modos de rotação, aos modos de oscilação de seus núcleos atômicos e aos movimentos periódicos de seus elétrons nas distintas órbitas. Se for possível medir o comprimento da onda dos fótons emitidos por uma molécula ou átomo, então é possível deduzir uma considerável quantidade de informações sobre sua estrutura e sobre os distintos modos de movimento periódico de seus componentes. A maioria das informações que os físicos têm sobre a estrutura do átomo foi obtida mediante espectroscopia. Os dois principais usos da análise espectral estão na química e na astrofísica. O espectro de um determinado elemento é absolutamente característico desse elemento. Quando se estimula uma substância desconhecida mediante uma chama, um arco voltaico, uma fagulha ou outro método apropriado, uma análise rápida com um espectrógrafo costuma ser suficiente para determinar a presença ou a ausência de um determinado elemento. Os espectros de absorção são, muitas vezes, úteis para identificar compostos químicos. Os métodos magnéticos de espectroscopia na região do espectro das radiofrequências são muito úteis para proporcionar informação química sobre as moléculas e mostrar sua estrutura detalhada (BUNGE, 1977; LI-CHAN, 1996).



FIGURA A.8 - Alguns modelos de Espectrofotômetros
FONTE: www.shimadzu.com.br (acesso em 14/09/2010)

Ressonância paramagnética eletrônica (EPR - *Electron Paramagnetic Resonance*) é a absorção ressonante de radiação eletromagnética por sistemas compostos de elétrons desemparelhados na presença de um campo magnético. É uma técnica bastante sensível de espectroscopia, não destrutiva, e diz respeito à detecção de elétrons desemparelhados (aqueles que ocupam sozinhos um orbital atômico ou molecular) de uma amostra. Grande parte dos cristais iônicos ou covalentes possui elétrons nas camadas de valência com *spins* eletrônicos e momento angular que se apresentam aos pares, e assim, cancelam-se mutuamente devido às fortes forças elétricas associadas às ligações químicas, não havendo interação entre os *spins* dos elétrons e um

campo magnético externo. Estes materiais são ditos *diamagnéticos*. No entanto, alguns átomos e moléculas contêm um ou mais elétrons com *spins* não pareados, e, portanto, se colocados em um campo magnético externo, ganham uma magnetização proporcional à intensidade deste campo aplicado, esses materiais são chamados *paramagnéticos*. Desta forma, as substâncias paramagnéticas são detectáveis à espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica. Paramagnetismo pode aparecer em um cristal devido às impurezas com excesso ou falta de elétrons em relação aos íons ou átomos da rede cristalina, e também por causa de defeitos pontuais intrínsecos como, por exemplo, vacâncias de átomos na rede (PINHEIRO, 2005).

A absorção da radiação ionizante por determinados compostos leva à formação de radicais livres, espécies que possuem elétrons desemparelhados, que de acordo com seu tempo de vida, podem ser detectados pela EPR. Normalmente, os radicais livres são espécies transientes de duração bastante curta. A concentração de radicais livres em uma amostra, gerados ou não pela irradiação, pode ser determinada a partir da intensidade do sinal de EPR. Este sinal, devido ao método usado na detecção, aparece no espectro sob a forma matemática da derivada da curva da absorção e a concentração dos radicais livres presentes pode ser calculada através da área sob a curva resultante. Em alguns poucos casos específicos, a identidade dos radicais livres presentes na amostra pode ser determinada pelo aspecto característico do espectro de EPR (DESROSIERS *et al.*, 1996 apud LEAL *et al.*, 2004).

Desde que foi descoberta por Zavoisky em 1944, a Ressonância Paramagnética Eletrônica têm-se desenvolvido rapidamente e vem sendo aplicada em um grande número de áreas de pesquisa. Essencialmente ela forma um ramo da espectroscopia de alta resolução usando frequências na região de microondas. A técnica de EPR é considerada um importante instrumento para o estudo de centros de cor em gemas, dopagens e defeitos em semicondutores, transições de fase em cristais, defeitos causados por raios-X e raios- γ , sorção de metais de transição por filtros biológicos e análise de compostos químicos orgânicos. É ainda empregada no estudo da formação e das reações de radicais livres em sistemas biológicos e espécies no estado tripleto (PINHEIRO, 2005; ORTON, 1968 apud ANTUNES, 2001).

A absorção de microondas é medida em função do campo magnético pelo aparelho espectroscópio de EPR. As informações obtidas experimentalmente das análises das amostras incluem: largura de linha; fator espectroscópico; parâmetros das interações - finas, hiperfinas e superhiperfinas; comportamento de saturação; concentração de spin eletrônico e identificação de radicais livres orgânicos. Um destaque da EPR é pelo fato de que suas medidas são várias ordens de intensidade mais sensíveis do que muitas outras técnicas espectroscópicas e requer relativamente pouca quantidade de amostra (SARACENO *et al.*, 1961 apud ANTUNES, 2001).

A detecção direta por espectroscopia óptica ou EPR dos radicais livres é muito difícil devido à alta instabilidade de sua estrutura e período de vida média muito curto, desta forma utilizam-se processos indiretos como é o caso do método “*spin trapping*”. Esse método consiste na reação de um composto orgânico, o *spin trap* (armadilha de spin), com os radicais em estudo, formando espécies paramagnéticas mais estáveis, ou seja, com período de vida mais longo, denominadas *spin adducts*, as quais podem ser detectadas e identificadas por meio de ressonância paramagnética. Diferentes *spin adducts* apresentam espectros EPR definidos. Na FIG. A.9 pode-se observar um exemplo de uma reação genérica de um radical livre com um *spin trap* (BUETTENER, 1990).

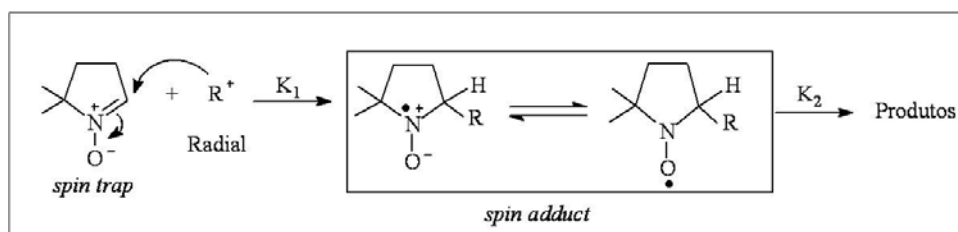


FIGURA A.9 Reação de um radical livre com um *spin trap*.

Anexo B

B.1 Classificação dos principais fotoabsorvedores

Photofrin[®] (dihematoporfirina ester), é o FS mais extensivamente estudado, tem sua fórmula comercial disponível por mais 30 anos, é o agente fototerapêutico mais utilizado clinicamente, embora não seja o mais adequado, já que entre os seus efeitos colaterais está a indução de prolongada fotossensibilidade na pele, além de apresentar demora em ser eliminado do organismo. Esse composto e os derivados do hematoporfirina (HPDs) são considerados como os FS de primeira geração. As clorinas são porfirinas reduzidas. Os FS de segunda geração incluem ALA (Levulan[®]), derivados da benzoporfirina (Visudyne[®] - BPDMA), temoporfina (mTHPC), entre outros. O ALA é um precursor, ou seja, é o material de partida para todas as porfirinas *in vivo*, é ciclizado por biossíntese, gerando a protoporfirina IX, que é a espécie fotoativa. O Foscan[®] (mTHPC) é o FS de segunda geração de maior potência, apresentando atividade 100 vezes maior do que o Photofrin[®], como foi relatado por Allison *et al.* (2004). Esses mesmos autores em 2006 relataram que esses FS têm maior potencialidade para gerar oxigênio do singlete; entretanto, podem causar dor significativa durante a terapia, e, por isso, mesmo utilizando luz de baixa intensidade (60 watts) podem provocar na pele severa fotossensibilidade. Os FS de terceira geração incluem atualmente compostos que são associados com anticorpos monoclonais, com anticorpo carregador de proteína, sistemas receptor de proteína e conjugados com marcadores radioativos (KONOPKA *et al.*, 2007).

A clorina e6 é uma forma derivada da clorofila que apresenta duas importantes propriedades: maior rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e intensa banda de absorção em comprimentos de onda maiores (650-660 nm) que as porfirinas (610-630 nm), onde os tecidos biológicos são mais transparentes à luz (RESHETNICKOV *et al.*, 2000).

Os corantes fenotiazínicos tais como azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (AM), exibem intensa absorção de 600-660 nm, região do espectro útil em terapia fotodinâmica por estar na “janela terapêutica” requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos. A “janela terapêutica”, em termos de comprimento de onda, é a faixa do espectro entre 600 a 800 nm, onde há pouca absorção da luz por sangue e água, assim será maior a penetração destes comprimentos de onda no tecido. O azul de metileno (AM) é um composto aromático heterocíclico solúvel em água. É usado como corante bacteriológico e como indicador, tem muitas aplicações nos mais variados campos como a biologia e da química. O AM é um fotoabsorvedor catiônico e sua carga positiva promove uma ligação eletrostática na superfície externa da célula, causando um dano

inicial a sua parede e induzindo uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias. Esse sensibilizador tem sido usado clinicamente no tratamento de câncer de bexiga e, recentemente, contra tumores de esôfago inoperáveis, virulências da pele, psoríase e adenocarcinomas. É também empregado como FS em desinfecção viral do sangue. Apresenta ainda, propriedade eletrocatalítica em fase NADH₄, que é a coenzima das enzimas desidrogenases (ORTH *et al.*, 2000; MEISEL *et al.*, 2005).

Embora as ftalocianinas possam ser consideradas como derivadas de porfirinas, seu caráter aromático aumentado explica sua absorção mais intensa no infravermelho próximo quando comparada à absorção dos núcleos de porfirina originais. Como FS, as ftalocianinas fornecem alto rendimento de produção de oxigênio singleto, maior que de um FS padrão como o AM (WAINWRIGHT, 2002).

Xantenos são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível. Alguns exemplos de xantenos são Rosa de Bengala, Eosina Y, Fluoresceína e Eritrosina B. Uma característica importante dos corantes xantenos é que não se ligam à membrana celular e localizam-se no citoplasma. Rosa de Bengala é um haletto derivado da fluoresceína que tem sido usado em oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias doenças externas ao olho. Como FS o Rosa de Bengala pode matar microrganismos, tais como vírus, bactérias e protozoários. Em um ambiente aquoso contendo nucleotídeos, o mecanismo fotodinâmico da Rosa de Bengala sob irradiação em 532 nm é predominantemente do tipo II, gerando 80% de oxigênio singleto e os restantes 20 % de ânion superóxido. Eritrosina tem atividade antimicrobial contra bactérias orais Gram-positivas e Gram-negativas. Eritrosina tem uma vantagem sobre outros fotoabsorvedores em desenvolvimento uma vez que tem completa aprovação para uso na boca. Eosina Y é um derivado tetrabromo da fluoresceína e pode ser usado para corar o citoplasma, o colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio. (SCHAFER *et al.*, 2000).

Vitamina B₂, ou riboflavina, essencial na dieta humana, é um agente comprovadamente não tóxico que pode ser usado na fotodesinfecção dos produtos do sangue, uma vez que nesse processo as principais preocupações são os prováveis efeitos colaterais nos receptores do sangue. A fotoquímica da riboflavina é bem conhecida, bem como suas interações com ácidos nucleicos. Embora esse tipo de estudo esteja apenas em sua fase inicial, sabe-se que riboflavina é ativa em cada um dos principais componentes do sangue sem dano significativo a essas estruturas, inclusive no uso em RBC. O espectro de absorção da riboflavina em solução aquosa neutra na zona do ultravioleta-visível apresenta picos principalmente compreendidos entre 210 e 280 nm.(HEELIS, 1982; SOUZA *et al.*, 2005; WAINWRIGHT, 2002).

A hipericina (Hp) é um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família *Guttiferae*. indicada em quadros de distúrbios psicovegetativos, estados depressivos leves e moderados, medo e/ou agitação emocional. O composto exibe uma potente atividade fototóxica antitumor *in vitro* e *in vivo*. Hipericina é provavelmente o mais potente FS encontrado na natureza. Relatos recentes tem mostrado que é possível explorar a fotoatividade da Hp no tratamento de psoríase e outras doenças da pele. Atualmente, a Hp produzida sinteticamente tem sido estudada como uma nova geração de fármacos para utilização em aPDT e alguns resultados indicam que este FS pode induzir tanto a apoptose quanto a necrose de células tumorais. A Hp forma com íons lantanídeos (La^{3+} e Eu^{3+}) um complexo que exibe grande rendimento quântico de geração de oxigênio singleto e janela de absorção deslocada para a região do vermelho O espectro de absorção da hipericina apresenta picos principalmente compreendidos entre 460 e 590 nm, quando dopada com os íons lantanídeos a banda de absorção desloca-se e apresenta pico principal em 620 nm (KAMUHABWA *et al.*, 1999; AGOSTINIS *et al.*, 2002).

Psoralenos são furano-derivados de cumarinas e apresentam em sua estrutura uma cumarina (1,2-benzopirona) condensada a um anel furano. O uso de psoralenos, como o princípio ativo da *Psoralea corylifolia* (família *Leguminosae*), para a repigmentação da pele já era descrito detalhadamente pelos hindus na Índia antiga, no seu sistema de medicina, o *Ayurvedic*. Em muitos escritos médicos antigos que datam de antes de 200 d.C., o tratamento de leucoderma (vitiligo) com as plantas *vasuchika* ou *bavachee* (*Psoralea corylifolia*) já era descrito, mostrando a necessidade de exposição da parte afetada ao sol, como forma de adoração ou prece. Sabe-se que essa planta contém alguns dos psoralenos descritos anteriormente e outras furocumarinas (PATHAK, *et al.*, 1992).

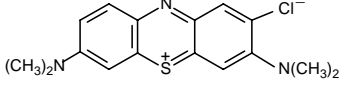
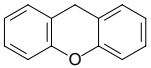
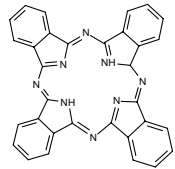
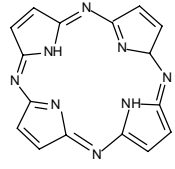
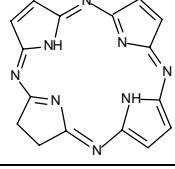
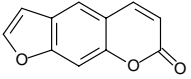
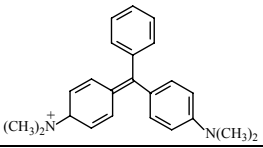
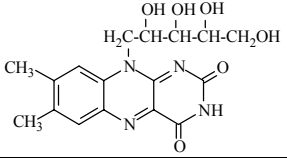
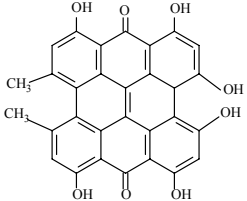
O verde malaquita é um corante usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme oral aderido aos elementos dentais. A molécula deste corante também apresenta afinidade com a albumina no soro bovino e lipídios, incluindo substâncias com formula estrutural similar a lipídios. Este corante apresenta uma banda de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético. Sua molécula é catiônica e pertence à família dos trifenilmetanos com três anéis benzênicos (PRATES, 2005).

No QUADRO 1 estão ilustradas algumas das estruturas químicas básicas dos FS mais comuns, bem como alguns nomes comerciais.

QUADRO 1

Estruturas químicas básicas e banda de absorção dos FS

Estrutura química básica	Exemplos	Banda de absorção
Fenotiazínicos		

	<p>Laranja de acridina Azul de metileno Azul de toluidina</p>	600 nm - 670 nm.
<p>Xantenos</p> 	<p>Rosa de belgala Eosina Eritrosina Fluoresceína</p>	520 nm a 540 nm
<p>Ftalocianinas</p> 	<p>Ftalocianinas metalo- sulfonadas</p>	660-700 nm
<p>Porfirinas</p> 	<p>Porfirina e derivados (Photofrin®) Acido 5-aminolevulínico (ALA - Levulan®) Derivados da benzoporfirina (Visudyne®)</p>	610-630 nm
<p>Clorinas</p> 	<p>Mono-L-aspartil clorina e6 Temoporfin (Fonscan®) Talaporfina sódica</p>	650-660 nm
<p>Furocumarinas</p> 	<p>psoralen</p>	320-400 nm
<p>Trifenilmetilénico</p> 	<p>Verde de malaquita</p>	625nm
<p>Riboflavina</p> 	<p>Vitamina B2</p>	210 e 280 nm
<p>Hipericina</p> 	<p>Hipericina</p>	460 e 590 nm

FONTE - KONOPKA *et al.*, 2007. p. 696.(modificado)