

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

SUZAMAR MOURA COSTA ROSA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL FOTODINÂMICO DE TRÊS
FOTOSENSIBILIZADORES ASSOCIADOS A UMA LÂMPADA DE
LEDs SOBRE CULTURAS DE *Enterococcus faecalis***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2011

SUZAMAR MOURA COSTA ROSA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL FOTODINÂMICO DE TRÊS
FOTOSENSIBILIZADORES ASSOCIADOS A UMA LÂMPADA DE
LEDs SOBRE CULTURAS DE *Enterococcus faecalis***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia–DAQBI da Universidade Tecnológica Federal do Paraná–UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Josmaria Lopes de Moraes.

CURITIBA

2011

TERMO DE APROVAÇÃO

SUZAMAR MOURA COSTA ROSA

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL FOTODINÂMICO DE TRÊS FOTOSENSIBILIZADORES ASSOCIADOS A UMA LÂMPADA DE *LEDs* SOBRE CULTURAS DE *Enterococcus faecalis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e **APROVADO** pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – PROF^a. DR^a. ADRIANE MARTINS DE FREITAS
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Membro 2 – PROF^a. DR^a. MARLENE SOARES
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Orientadora – PROF^a. DR^a. JOSMARIA LOPES MORAIS
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Física (DAFIS)

Coordenadora de Curso – PROF^a. DR^a. VALMA MARTINS BARBOSA

Curitiba, 22 de novembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, à minha orientadora Josmaria Lopes de Moraes, aos membros da banca avaliadora Adriane Freitas e Marlene Soares, aos meus colegas de laboratório e amigos por todo apoio me dado para realização deste trabalho.

Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre (Charles Chaplin).

RESUMO

ROSA, Suzamar M. C.. 2011. 58 f. Comparação do potencial fotodinâmico de três fotossensibilizadores associados a uma lâmpada de LEDs sobre culturas de *Enterococcus faecalis*. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

Em terapia fotodinâmica utiliza-se uma fonte luminosa, um fotossensibilizador e oxigênio no meio reacional para produzir como resultado espécies altamente reativas capazes de provocar inviabilização de microrganismos tais como bactérias e fungos. Nesta pesquisa foi avaliada presuntivamente a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e se avaliou os espectros de absorção óptica dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina em solução salina 0,9%. No estudo foi comparado o potencial antimicrobiano dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina nas concentrações de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L associados ou não à uma lâmpada de LEDs de potência 1,5 W e emitindo na faixa do vermelho sobre culturas de *Enterococcus faecalis*. As densidades de energia aplicadas foram de $44,7 \text{ J/cm}^2$, $89,5 \text{ J/cm}^2$ e $179,0 \text{ J/cm}^2$. Os resultados obtidos confirmaram as características da cepa bacteriana em estudo com a literatura. Os espectros dos fotossensibilizantes apresentaram diferenças nas zonas de maior absorção. A lâmpada em estudo isoladamente e os pigmentos na ausência de luz exibiram efeito bactericida sobre as culturas microbianas. O corante azul de metileno apresentou maior eficiência na presença e na ausência de fonte luminosa.

Palavras – chave: Terapia fotodinâmica. Fotossensibilizadores. *Enterococcus faecalis*. Diodo emissor de luz.

ABSTRACT

ROSA, Suzamar M. C. Comparison of the potential of photodynamic photosensitizers associated with three LED lamp on cultures of *Enterococcus faecalis*. 2011. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

In photodynamic therapy uses a light source, a photosensitizer and oxygen in the reaction to produce highly reactive species as a result capable of causing non-viability of microorganisms such as bacteria and fungi. This research evaluated presumptively strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and evaluated the optical absorption spectra of the photosensitizers methylene blue and toluidine blue in 0,9% saline solution. The study compared the antimicrobial potential of photosensitizers methylene blue and toluidine blue at concentrations of $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L associated or not with a red LED lamp power 1,5 W on cultures of *Enterococcus faecalis*. The energy densities applied were 44,7 J/cm², 89,5 J/cm² e 179,0 J/cm². The efficiency of malachite green dye under the same conditions cited study of the dyes but and concentrations ten times smaller and using longer periods of irradiation was also evaluated. The results confirmed the characteristics of the strain bacterin in the study of literature. The spectra of photosensitizers differ in areas of a greater absorption. The lamp itself and the pigments with no light exhibited bactericidal effect on microbial cultures. The methylene blue showed greater photodynamic efficiency in presence and absence of light.

Keywords: Photodynamic therapy. Photosensitizers. *Enterococcus faecalis*. LED light.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AM	Azul de Metileno
AT	Azul de Toluidina
ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C _f de FS	Concentração final de fotossensibilizador
DAQBI	Departamento Acadêmico de Química e Biologia
EPU	Espuma de Poliuretano
EPUs	Espumas de Poliuretano
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
FSs	Fotossensibilizadores
LASER	<i>Light Amplication by Stumulated Emission of Radiation</i>
LED	<i>Light Emiting Diode</i>
LEDs	<i>Light Emiting Diodes</i>
L ⁻ + FS ⁻	Ausência de fonte luminosa e Ausência de fotossensibilizador.
L ⁻ + FS ⁺	Ausência de fonte luminosa e Presença de fotossensibilizador.
L ⁺ + FS ⁻	Presença de fonte luminosa e Ausência de fotossensibilizador.
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
S.S.	Solução salina
s.s.	Solução salina
SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
t1	Tempo 1
t2	Tempo 2
t3	Tempo 3
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
u.a.	Unidades de Absorbância
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
V _f	volume final (fotossensibilizador + solução salina + suspensão estoque bacteriana)
V de FS	volume de fotossensibilizador
V de SE	volume de suspensão estoque bacteriana
V de S.S.	volume de solução salina
VM	Verde Malaquita
VG	Violeta de Gensiana

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
XX	Vinte
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
Λ	Comprimento de onda
Nm	Nanômetros
mol/L	Mol por litro
J/cm ²	Jaule po centímetro quadrado
μ M	Micromol
mg/mL	Miligramma por mililitro
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
³ O ₂	Oxigênio no estado fundamental
OH [°]	Radical hidroxila
[°] O ₂ ⁻	Ânion - radical superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
¹ O ₂	Oxigênio singlete
³ S ₁ [*]	Fotossensibilizador no estado triplete
C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S.XH ₂ O	Fórmula molecular do azul de metileno
C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ SZn	Fórmula molecular do azul de toluidina
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
W	Watt
V	Volts
G	Gramma
mA	Miliampère
Hz	Hertz
Lm	Lúmen
MHz	Mega – hertz
g/mol	Gramma por mol
μ m	Micrômetro
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro
H	Hora
S	Segundo
X	Abcissa
Y	Coordenada
mW	Miliwatt

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema do mecanismo de ação da TFD.....	18
FIGURA 2 – Reações do tipo I.....	21
FIGURA 3 – Reações do tipo II.....	22
FIGURA 4 – Estrutura química do corante azul de metileno.....	25
FIGURA 5 – Estrutura química do corante azul de toluidina.....	26
FIGURA 6 – Sistema mecânico empregado para retenção do corante violeta de genciana por espuma de poliuretano em meio contendo dodecilsulfato de sódio.....	27
FIGURA 7 – Equação para cálculo de dosimetria.....	28
FIGURA 8 – Espectro visível.....	29
FIGURA 9 - Cocos gram positivos de <i>Enterococcus faecalis</i>	30
FIGURA 10 – Teste de toxicidade.....	36
FIGURA 11 – Lâmpada de <i>LEDs</i> vermelha utilizada.....	37
FIGURA 12 – Teste de fototoxicidade	39
FIGURA 13 – Dimensões do sistema utilizado para irradiar amostras. Em detalhe as medidas da placa de microtitulação.....	40
FIGURA 14 – Suporte de madeira com lâmpada de <i>LEDs</i> irradiando placa de microtitulação de 96 poços.....	41
FIGURA 15 – Colônias de <i>Enterococcus faecalis</i> com crescimento de 24h em meio <i>PCA</i>	42
FIGURA 16 – Espectros de absorção óptica dos fotossensibilizadores AM e AT nas concentrações de 5×10^{-5} mol/L em solução salina 0,9%.	43
FIGURA 17 – Áreas da superfície da lâmpada que sofreram medição de iluminância.....	44
FIGURA 18 – Gráfico comparativo entre AM e AT de acordo com a porcentagem de inibição (%) e densidade de energia aplicada (J/cm^2). As barras verticais representam os desvios-padrões.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Equipamentos utilizados e os respectivos laboratórios fornecedores.....	31
TABELA 2 – Fotossensibilizadores em pó e especificações do rótulo.....	32
TABELA 3 – Condições experimentais dos grupos testados.....	37
TABELA 4 – Volumes e concentrações de microrganismos e de fotossensibilizadores depositados em tubos com tampa.....	40
TABELA 5 – Médias de iluminância em lux para os setores 1,2 e 3.....	44
TABELA 6 – Densidades de energia (J/cm^2) calculadas para cada tempo de irradiação (s) considerando-se a potência (W) e área (cm^2) de cada micropoço irradiada.....	45
TABELA 7 – Porcentagens de inibição (%) com desvios – padrão dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina obtidas em relação ao grupo $L^- + FS^-$ de cada corante.	46
TABELA 8 – Porcentagens de inibição (%) do fotossensibilizador verde malaquita obtidas em relação ao grupo $L^- + FS^-$ levando – se em consideração o tempo de irradiação.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 QUESTÃO DE PESQUISA	15
1.2 ABRANGÊNCIA DO ESTUDO	15
1.3 OBJETIVOS	15
1.3.1 Objetivo geral	15
1.3.2 Objetivos específicos	16
1.4 JUSTIFICATIVA	16
1.5 ESTRUTURA	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA - TERAPIA FOTODINÂMICA	18
2.1 APLICAÇÕES	19
2.2 MECANISMOS DE INTERAÇÃO	20
2.2.1 Parâmetros a serem considerados na aplicação da técnica	22
2.3 TEMPO DE PRÉ-IRRADIAÇÃO	23
2.4 AGENTES FOTOSSENSIBILIZANTES	23
2.4.1 Azul de metileno	25
2.4.2 Azul de Toluidina	26
2.5 RESÍDUOS DE FOTOSSENSIBILIZADORES	26
2.6 FONTES DE LUZ	27
2.6.1 LEDs – Diodos emissores de luz	28
2.7 CÉLULA BACTERIANA	29
3 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	31
3.1.1 Identificação e preparo dos fotossensibilizadores	32
3.3 CONFIRMAÇÃO PRESUNTIVA DA ESPÉCIE	33
3.4 INOCULAÇÃO BACTERIANA	33
3.5 ESCOLHA DA MELHOR DILUIÇÃO BACTERIANA	34
3.6 ESPECTROSCOPIA	34
3.7 MEDIDAS DE ILUMINÂNCIA	35
3.8 TESTES DE TOXICIDADE DOS FSs	35
3.9 TESTES DE FOTOTOXICIDADE DOS FSs	36
3.10 RESÍDUOS GERADOS	41

4 RESULTADOS OBTIDOS E ANÁLISE	42
4.1 TESTES PRESUNTIVOS PARA <i>Enterococcus faecalis</i>	42
4.2 DIFERENÇAS ESPECTROSCÓPICAS DOS CORANTES AZUL DE METILENO E AZUL DE TOLUIDINA	42
4.3 MEDIDAS DE ILUMINÂNCIA.....	43
4.4 COMPARAÇÃO DA REDUÇÃO MICROBANA ENTRE AZUL DE METILENO E AZUL DE TOLUIDINA.....	45
4.4.1 Densidades de energia	45
4.4.2 Comparação entre FSs.....	45
4.5 OUTROS TESTES REALIZADOS	48
4.6 DIFICULDADES ENCONTRADAS	50
5 CONCLUSÕES	51
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Em terapia fotodinâmica (TFD) utiliza-se de uma fonte de radiação, geralmente um *LASER* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), associado a oxigênio encontrado nas células e de um fotossensibilizador (FS) para produzir como resultado substâncias altamente reativas capazes de provocar a morte celular em microrganismos tais como bactérias e fungos (GARCEZ et al., 2007).

A TFD oferece vantagens tais como morte celular rápida e não indução de resistência nos microrganismos devido à ação de agentes citotóxicos produzidos pela ação fotodinâmica. Contudo, é dependente de uma série de fatores para que sua aplicação seja efetiva, dentre eles, a necessidade da presença de fonte de luz de comprimento de onda compatível com o fotossensibilizador empregado e da presença de oxigênio no meio reacional (PERUSSI, 2007). Além disso, o tipo de microrganismo utilizado (no caso da modalidade antimicrobiana) deve ser considerado porque diferentes organismos respondem de variadas formas à aplicação da técnica.

Para emprego em terapia fotodinâmica, os *LEDs* (*Light Emitting Diodes*) se constituem com uma alternativa ao uso dos *LASERs*. De acordo com Konopka e Goslinski (2007) as vantagens do emprego de fontes a base de *LEDs* são baixo custo e disponibilidade no mercado. Os *LEDs* podem ser encontrados em variadas regiões espectrais embora os mais conhecidos são os que emitem luz na faixa do vermelho, sendo que estes possuem comprimento de onda compatível com FSs tais como o azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT).

Diversos estudos têm descrito os benefícios da TFD visando a redução bacteriana (GOMES, 2003; PAOLI, 2005; MARINHO, 2006; CAVALHEIRO, 2007; MAROTTI, 2008; BAPTISTA, 2009; PASCHOAL, 2009; ALFENAS et al., 2011). No entanto, em cada estudo foram utilizadas metodologias diferentes proporcionando resultados que não podem ser facilmente comparados. Para *Enterococcus faecalis* são encontrados principalmente estudos relacionados em área odontológica e, em geral, os parâmetros de concentração de fotossensibilizadores e de dose de

radiação não são bem esclarecidos. Portanto, há a necessidade de novos estudos sobre a técnica.

1.1 QUESTÃO DE PESQUISA

A pergunta norteadora do trabalho é: qual é o potencial antimicrobiano de cada fotossensibilizador, azul de metileno e azul de toluidina, ativados por luz proveniente de lâmpada de *LEDs*, em presença de oxigênio, sobre culturas de *Enterococcus faecalis*?

1.2 ABRANGÊNCIA DO ESTUDO

O estudo foi fundamentado no âmbito da terapia fotodinâmica antimicrobiana, a qual emprega um fotossensibilizador, que, associado a uma fonte de luminosa adequada, em presença de oxigênio, promove a inviabilização celular bacteriana, em condições compatíveis para ocorrência de sua ação. O trabalho avaliou o potencial de atuação da terapia fotodinâmica antimicrobiana empregando culturas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina ativados por lâmpada de diodo emissor de luz (*LED*).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas *Enterococcus faecalis* utilizando-se dois tipos de fotossensibilizadores e lâmpada de diodo emissor de luz (*LED*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Verificar a pureza e características da cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 estudada através de testes presuntivos;
- Cultivar e manter o microrganismo;
- Comparar diferenças espectrais dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina em solução salina 0,9%;
- Estabelecer a iluminância da fonte de luz em estudo;
- Examinar a porcentagem de toxicidade dos FSs sem irradiação;
- Avaliar a eficiência antimicrobiana da ação fotodinâmica em culturas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, separadamente, empregando os fotossensibilizadores, azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita, ativados por fonte de lâmpada de diodo emissor de luz vermelha em três tempos de irradiação diferentes.

1.4 JUSTIFICATIVA

Estudos e procedimentos no domínio da terapia fotodinâmica são desenvolvidos em diversos países, porém, apesar do grande avanço do método não há um acordo sobre os parâmetros a serem empregados, justificando-se avaliações e estudos mais aprofundados sobre a técnica.

Algumas cepas bacterianas patogênicas conhecidas são resistentes a muitos antimicrobianos, tornando-se um grande problema de saúde pública. Esse fenômeno de resistência microbiana desperta interesse para métodos alternativos que não induzam tal condição, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Para o presente trabalho foi definido empregar a espécie *Enterococcus faecalis*, microrganismo gram positivo e resistente a diversos métodos de tratamentos.

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica pode ser uma boa alternativa para eliminação desses microrganismos porque não induz estes à resistência devido às diversas moléculas-alvo danificadas pela sua ação.

1.5 ESTRUTURA

A primeira parte do trabalho (Introdução) trata do surgimento e definição da terapia fotodinâmica com suas aplicações, apresentação dos mecanismos de interação e parâmetros a serem considerados. A Fundamentação teórica corresponde ao embasamento teórico das principais fontes consultadas. Terapia fotodinâmica, microrganismos, fotossensibilizadores e fontes de radiação são apresentadas, além de um tópico sobre o tratamento da água contendo resíduos de corantes.

Em Equipamentos, Materiais e Métodos foram relacionados os materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. A parte metodológica apresenta a sequência de ativação, repique e escolha de melhor diluição bacteriana empregada. Posteriormente há a exibição dos procedimentos de testes de toxicidade e fototoxicidade.

A quarta parte Resultados Obtidos e Discussão apresenta e discute os dados encontrados no decorrer do estudo.

Em Conclusões são resumidas as ideias principais obtidas com a realização do estudo e são apresentadas sugestões de trabalhos futuros nesta linha de pesquisa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA - TERAPIA FOTODINÂMICA

Segundo Torezan; Niwa; Neto (2009) e Perussi (2007) a terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade utilizada para tratamento de moléstias em diversas áreas da medicina e também para inativação microbiana. O método consiste na “utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos e ativação destas pela presença de fonte luminosa. As células consideradas alvo são coradas com o fotossensibilizador e irradiadas com luz.” (PRATES et al, 2010). A Figura 1 esquematiza a ação da TFD.

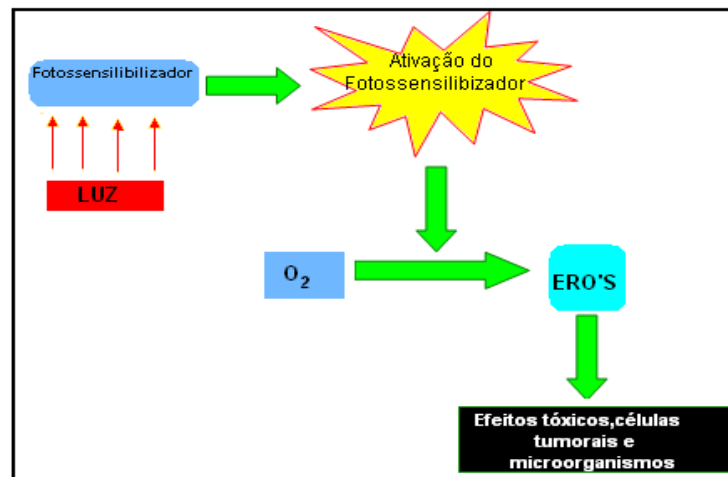


Figura 1: Esquema do mecanismo de ação da TFD.
Fonte: modificado de Paoli (2005).

O termo é relativamente recente, mas a modalidade é antiga. O método se originou no início do século XX em Munique, local onde Oscar Raab, um aluno de medicina, notou resultados provenientes da fotossensibilização em paramécio utilizando acridina como agente fotossensibilizante. A partir dos estudos, pesquisadores começaram a estudar se a luz possuía algum papel nos resultados. Posteriormente, concluiu-se que a substância acridina vinculada à luz era tóxica ao paramécio, comparado a ação isolada da luz ou do agente acridina sozinho.

Antes da ocorrência da Segunda Grande Guerra Mundial, a técnica da TFD foi corroborada em microrganismos tais como bactérias, vírus e protozoários; porém, devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina, sua aplicação foi abandonada. A volta da utilização da técnica na última década ocorreu devido a

fatores como disseminação da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) assim como ao aumento de infecções hospitalares, causadas por bactérias resistentes aos fármacos administrados (PERUSSI, 2007).

Portanto, há grande necessidade e importância de estudos sobre novas técnicas antimicrobianas que não induzam ao desenvolvimento de resistência (PERUSSI, 2007).

2.1 APLICAÇÕES

A TFD tem sido efetiva contra bactérias, fungos e vírus, sendo aplicada na desinfecção de sangue, periodontia, desinfecção de água, parasitas patogênicos humanos e tratamento de alimentos (PERUSSI, 2007). Além disso, a técnica é utilizada na medicina para tratamento de doenças oncológicas.

O emprego da TFD oferece algumas vantagens quando comparadas ao uso de agentes antimicrobianos habituais, como morte celular rápida e improvável desenvolvimento de resistência, por parte do microrganismo (TEGOS; HAMBLIN, 2006). Segundo Perussi (2007) isso se deve à produção de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico.

Prates (2010) estudou a influência dos parâmetros de irradiação de TFD em leveduras, utilizando duas taxas de fluência (100 mW/cm^2 e 300 mW/cm^2), três tempos de irradiação (3, 6 e 9 minutos), irradiação com laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$) e azul de metileno como FS (concentração de 10^{-6} mol/L) sendo os experimentos efetuados em placas de microtitulação de 96 poços. Como resultado obteve aproximadamente 6 logs de morte celular. Nem o FS e nem a luz isolada promoveram significativa inibição microbiana.

Marinho (2006) avaliou a eficiência da TFD sobre culturas de *Candida* sp em três valores de dose (100 J/cm^2 , 270 J/cm^2 e 450 J/cm^2), empregou laser (In–Ga–Al) e azul de metileno como FS (concentração de $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Os resultados indicaram que a dose de 450 J/cm^2 apresentou 72,42 % de inibição microbiana.

Müller (2006) analisou o potencial da TFD sobre culturas de bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*

utilizando laser diodo com meio ativo de Arsenieto de Gálio Alumínio ($\lambda = 685 \text{ nm}$), com dose de $4,5 \text{ J/cm}^2$ e AM como agente fotossensibilizante (concentração $5,34 \mu\text{M}$). A irradiação foi realizada em placa de 24 poços. O autor observou redução significativa nos valores de unidades formadoras de colônia (UFC) de todas as bactérias estudadas na ausência e presença de fonte luminosa e relatou que o grau de morte das células bacterianas gram positivas foi dependente da concentração do FS.

Rossoni et al. (2011) estudou os efeitos da TFD sob culturas de *Candida albicans* utilizando laser de baixa potência ($\lambda = 660 \text{ nm}$), sob três densidades de energia ($15,8 \text{ J/cm}^2$, $26,3 \text{ J/cm}^2$ e $39,5 \text{ J/cm}^2$), associado à FSs tais como o azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita (à concentração de $0,1 \text{ mg/mL}$). Os resultados apontaram para redução no número de microrganismos tanto na presença quanto na ausência de laser.

Além disso, no estudo realizado por Rossoni et al. (2011), as maiores reduções observadas após a aplicação da TFD foram proporcionadas pelo azul de toluidina, seguido por azul de metileno e verde malaquita e com o aumento da dose aplicada também havia acréscimo na taxa de inibição microbiana.

Oliveira e Pinheiro (2011) avaliaram a capacidade de redução microbiana sobre microrganismos causadores de lesões de cáries dentárias com a utilização de FS azul de toluidina (à concentração de $0,005 \%$) associado a um laser de baixa intensidade e com comprimento de onda de 660 nm . Para a dose de 4 J/cm^2 foi obtida redução microbiana de $59,02 \%$ em relação ao total de bactérias viáveis.

Prates (2005) irradiou culturas de *A. actinomycetemcomitans* em suspensão com o fotossensibilizante verde malaquita associado à um laser de baixa intensidade (Ga-Al-As) vermelho, $\lambda = 660 \text{ nm}$, 30 mW de potência, 3 e 5 minutos de exposição, com taxa de fluência de $5,4 \text{ J/cm}^2$ e 9 J/cm^2 e observou que essa associação reduziu até $99,9\%$ o número de microrganismos viáveis.

2.2 MECANISMOS DE INTERAÇÃO

Para que a ação da TFD ocorra em células bacterianas, por exemplo, são necessários três componentes: uma substância fotossensibilizadora, luz visível de

comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do FS e oxigênio molecular.

De acordo com Ackroyd¹ et al., 2001 (apud AMARAL et al., 2010) “é importante que a luz seja absorvida pelo corante para que a TFD seja efetiva na inviabilização das células”.

Na aplicação da TFD, após a administração de certa dosagem de FS, irradia-se o local com luz visível a fim de excitar o fotossensibilizador. Este, no estado singlete excitado, pode decair para o estado fundamental ou então para o estado triplete excitado, o qual pode transferir energia e/ou elétrons para o oxigênio, no estado fundamental (³O₂) e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas, induzem um encadeamento de reações oxidativas que ocasionam inviabilização da células alvo (RIBEIRO; JORGE, 2005).

Os mecanismos responsáveis pela geração das EROs são as reações do tipo I e tipo II. No primeiro caso, há a formação de radicais livres $\cdot\text{OH}$ por meio da passagem de elétron entre o FS no estado triplete excitado e componentes do sistema, ocasionando a geração de $\cdot\text{O}_2^-$ (ânion–radical superóxido) (PERUSSI, 2007), conforme esquematizado na equações 1, 2 e 3 da Figura 2.

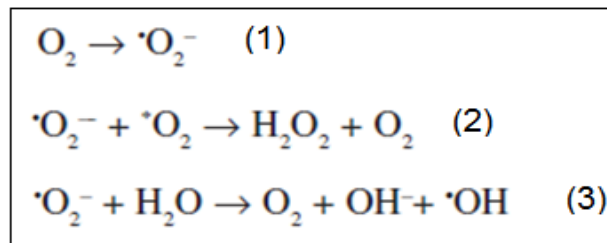


Figura 2: Reações do tipo I.
Fonte: Perussi (2007).

De acordo com Amaral et al. (2010) esta reação (tipo I) com água em meio microbiano pode elevar a presença dos radicais hidroxila, os quais podem reagir com biomoléculas ou se combinar para formação de H₂O₂ no local. Pode ocorrer ainda citotoxicidade devido à remoção de hidrogênio de fosfolipídios da membrana citoplasmática de bactérias, por exemplo, ocasionando danos à integridade e impermeabilidade da mesma; além disso, as inativações de enzimas da membrana e de receptores também podem ocorrer.

¹ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* v. 74, n. 5, p. 656 – 659, 2001).

No segundo caso (tipo II) ocorre transferência de energia do FS no estado tripleto, representado pelo $^3S_1^*$ e há formação de oxigênio no estado singlete 1O_2 (PERUSSI, 2007) agente altamente citotóxico (MACHADO, 2000) conforme ilustrado nas equações 4 e 5 da Figura 3.

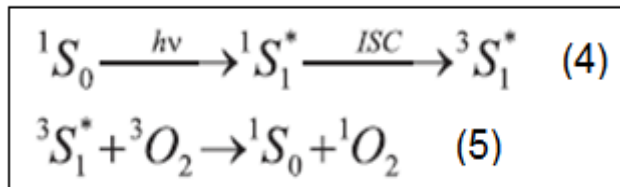


Figura 3: Reações do tipo II.
Fonte: Perussi (2007).

Na reação do tipo II o oxigênio singlete pode reagir com a parede celular, ácido nucléico, peptídeos e moléculas do alvo. Estas trabalham para manutenção da parede celular e membrana celular (AMARAL et al., 2010).

Ambas as reações indicam que o mecanismo de dano é dependente tanto da presença de oxigênio quanto da concentração do corante (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

2.2.1 Parâmetros a serem considerados na aplicação da técnica

De acordo com Gonzales (2007):

A determinação de parâmetros funcionais, como (1) concentração do fotossensibilizador, (2) duração do período de pré-incubação da célula com o fotossensibilizador antes da exposição à luz, (3) intensidade e o espectro de emissão necessário para a otimização da fotossensibilização e (4) duração do período de exposição, é essencial para que um fotossensibilizador possa ser utilizado com sucesso em um determinado sistema biológico.

Segundo Paoli (2005), em determinadas condições de iluminação, o resultado da fotossensibilização aumenta com o aumento da concentração do FS empregado, até que haja saturação dos seus sítios de interação com as células-alvo. Quando esses sítios tornam-se saturados, conseqüentemente, ocorre redução da eficiência da técnica, podendo até ocasionar sua ineficiência, o que pode ser explicado pelo

provável escudo ótico formado pelo corante em solução e pela formação de dímeros ou agregados superiores, o que ocorre com alguns FSs.

2.3 TEMPO DE PRÉ-IRRADIAÇÃO

O tempo de pré-irradiação trata do período que decorre entre o emprego do fotossensibilizador e sua ativação por fonte luminosa (WAINWRIGHT et al., 1997). Esse momento é necessário para que o corante se una ao microrganismo ou que ultrapasse a membrana celular, sendo assim, o fotossensibilizador não se altera antes que haja sua ativação pela luz (AMARAL et al., 2010).

Marinho (2006) e Prates (2005) utilizaram tempo de pré-irradiação de 5 minutos para azul de metileno e para verde malaquita aplicado em tratamento de *Candida sp.* e *A. actinomycescomitans*. Prates et al. (2010) consideraram adequado o tempo de 10 minutos para inviabilização de *Candida albicans*, *Candida Krusei* e *Cryptococcus neoformans* utilizando azul de metileno. Benvindo et al. (2008) adotaram como tempo de pré-irradiação 15 minutos com o fotossensibilizador azul de metileno.

2.4 AGENTES FOTOSSENSIBILIZANTES

Os agentes fotossensibilizantes são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, que em seu estado fundamental são inativos e possuem a característica de absorção da luz nas regiões do infravermelho, visível ou radiação ultravioleta A (JORI, 2004). Em função da habilidade de absorverem luz com alta eficiência em alguma região do espectro, alguns desses compostos (colorantes, pigmentos, corantes ou fotossensibilizadores), possuem a capacidade de induzir ou de participar de mecanismos fotoquímicos (MACHADO, 2000; PERUSSI, 2007).

Os FSs utilizados em TFD possuem diferenças quanto à sua estrutura e alvos celulares, embora o princípio (a ação fotodinâmica) seja o mesmo para tratamentos

como o câncer ou inativação microbiana. Para terapia fotodinâmica aplicada a microrganismos os fotossensibilizadores mais empregados são do grupo fenotiazínicos (Azul de Toluidina O e Azul de Metileno) e os xantenos (Rosa Bengala, Eosina Y, Eosina B) (BAGNATO et al. 2008).

De acordo com Prates et al. (2010):

Os estudos acerca de fotossensibilizadores desenvolveram-se muito nas últimas duas décadas, no entanto, os parâmetros de irradiação, como potência, taxa de fluência, tempo de irradiação e fluência, necessitam de mais estudos.

Os compostos azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT) são comercializados na forma de sais com o cromóforo do corante sendo catiônico. Em solução ambos são hidrofílicos. Apresentam estrutura química e propriedades físico-químicas parecidas, porém a eficiência fotodinâmica verificada é variável entre os diferentes microrganismos (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

As propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos monômeros dos dois fotossensibilizadores definem a eficácia dos mesmos (MARINHO, 2006) dependendo da capacidade para formação de dímeros (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003 apud MARINHO, 2006)².

Devido à hidrossolubilidade, esses corantes podem atravessar canais de proteína os quais são preenchidos por água, presentes externamente na membrana de bactérias (MARINHO, 2006). Quanto maior a concentração e tempo de residência do corante, maior o efeito antimicrobiano mesmo sem a presença de fonte luminosa. O grau de destruição bacteriana é maior quanto maior habilidade de difusão do FS através da membrana externa das bactérias. O AT apresenta maior solubilidade em regiões hidrofóbicas da membrana, conseqüentemente se concentra em maior escala no interior da célula (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001 apud MARINHO, 2006)³.

²USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **J. Photochem. Photobiol. B**, Lausanne, v. 71, n. 1 – 3, 2003.

³USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram – positive and gram – negative microorganisms. **Laser Surg. Med.** New York, v. 29, n. 2, p. 165 – 173, 2001.

Segundo estudos de Usacheva; Teichert; Biel² (2003 apud MARINHO, 2006):

Os corantes catiônicos azul de metileno e azul de toluidina interagem eletrostaticamente com os diferentes polímeros da superfície da célula bacteriana carregados negativamente. Isso induz à dimerização de moléculas de corante ligados aos sítios aniônicos dos polímeros bacterianos e formação de dímeros ligados à superfície da célula bacteriana. Portanto, hidrofobicidade, indicada pelo coeficiente de partição do corante; ligação de monômeros e dímeros à membrana celular bacteriana; e concentração do fotossensibilizador determinam o potencial bactericida deste.

Embora o azul de metileno tenha sido o fotossensibilizador mais presente nos estudos de TFD, de acordo com USACHEVA; TEICHERT; BIEL, (2001 apud GONZALES, 2007)³, há poucos estudos comparativos de eficiência antimicrobiana dos FSs azul de metileno e azul de toluidina.

2.4.1 Azul de metileno

O corante azul de metileno (Figura 4) apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot XH_2O$, pertence à família dos fenotiazínicos e possui molécula catiônica. O comprimento de onda máximo da banda de absorção se situa em 661 nm.

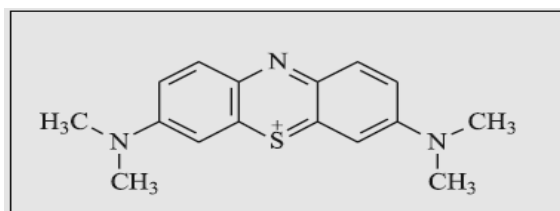


Figura 4: Estrutura química do corante azul de metileno.

Fonte: Perussi (2007).

De acordo com Perussi (2007) o azul de metileno apresenta baixa toxicidade o que justifica seu amplo uso em Terapia Fotodinâmica. Núñez (2007) relata que o AM apresenta a tendência em formar agregados, em concentrações maiores, em virtude da presença de agentes agregadores (polieletrólitos e solventes polares).

2.4.2 Azul de Toluidina

O corante azul de toluidina (Figura 5) dispõe de fórmula molecular $C_{15}H_{16}Cl_3N_3SZn$, assim como o azul de metileno, pertence à família dos fenotiazínicos e possui molécula catiônica. O comprimento de onda máximo da banda de absorção se situa em 626 nm.

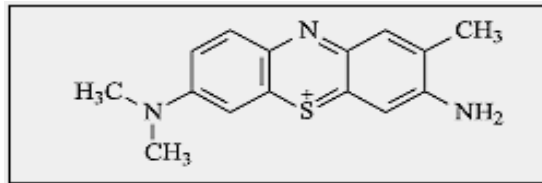


Figura 5: Estrutura química do corante azul de toluidina.

Fonte: Perussi (2007).

2.5 RESÍDUOS DE FOTOSSENSIBILIZADORES

Segundo Leite; Robaina; Cassella (2011) diversas substâncias químicas são produzidas e utilizadas por indústrias, resultando em contaminação dos corpos de águas. Um parâmetro de qualidade de águas importante é o da coloração, o qual é afetado pelas descargas de indústrias que utilizam corantes. Sendo assim, há grande importância no desenvolvimento processos de eficientes para controle desse tipo de contaminação ambiental.

Leite; Robaina; Cassella (2011) propõem uma metodologia fundamentada no método de sorção do corante verde malaquita por espuma de poliuretano–EPU, em meio contendo SDS-(Dodecil Sulfato de Sódio), atrelados a um sistema de agitação mecânica. Os resultados obtidos no estudo de caracterização do processo de sorção do corante verde malaquita (VM) por EPU indicaram que estas, em presença de surfactantes aniônicos (substâncias que aumentam a retenção do corante catiônico pelas EPU), são materiais eficientes para a extração do corante, possuindo a melhor relação molar VM / SDS igual a 5 em pH 7,0, sendo o equilíbrio adquirido após 60 minutos de agitação pelo sistema mecânico.

Mori; Cassella (2009) em estudo da sorção do corante catiônico violeta de genciana (VG) por EPU em meio aquoso contendo SDS, utilizando um sistema de

agitação para retenção do corante, conforme Figura 6, concluíram que EPU são boa alternativa para retenção do corante violeta de genciana, nas condições propostas, sendo a máxima sorção observada quando a concentração de SDS era 2,5 superior à do corante.

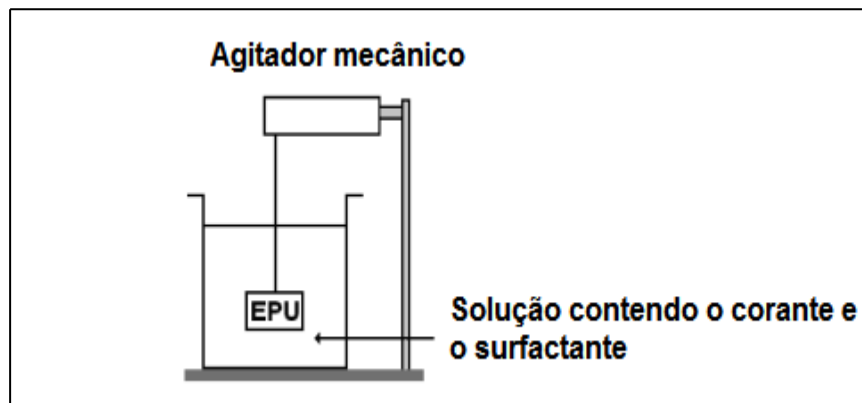


Figura 6: Sistema mecânico empregado para retenção do corante violeta de genciana por espuma de poliuretano em meio contendo dodecilsulfato de sódio.

Fonte: MORI; CASSELLA (2009).

A técnica pode ser empregada para a retirada de corantes como AM e AT da água resultando num líquido clarificado que pode ser empregado como líquido de condições menos nobres como para reuso.

2.6 FONTES DE LUZ

Dentre a ampla variedade de grupos de fontes de luz, coerentes e não coerentes, que podem ser utilizados em terapia fotodinâmica, podem ser citadas as lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo e *LASERs*, cuja ação dos equipamentos depende do espectro de emissão, da irradiância, da distribuição espacial da luz e da potência dos mesmos (TOREZAN; NIWA; NETO, 2009).

As irradiações comumente utilizadas em terapia fotodinâmica variam de 50 – 150 mW/cm², sendo o necessário tempo de irradiância, para fontes de baixa

intensidade, necessariamente muito longo. Em contrapartida, irradiâncias muito altas causam efeito térmico aditivo à técnica (TOREZAN; NIWA; NETO, 2009).

A Figura 7 ilustra a equação utilizada para cálculo da densidade de energia, referenciada como dose, por alguns autores da área de TFD. Conhecer a dose de energia contribui para a determinação da eficiência da terapia fotodinâmica (RAMOS; SOUSA; YOSHIMURA, 2010).

$$\text{Densidade de Energia (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)} \times \text{tempo (segundos)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

Figura 7: Equação para cálculo da dosimetria.
Fonte: MARINHO (2006).

2.6.1 LEDs – Diodos emissores de luz

Os diodos emissores de luz (*LEDs*) surgiram no início do século XX sendo utilizados em sistemas de iluminação por possuírem características como alta eficiência luminosa, longa vida útil, resistência a choques/vibrações e não possuírem gás ou filamentos no seu interior. Podem ser divididos em três categorias: indicativos, de alto brilho e de alta potência (PINTO et al., 2008).

Os *LEDs* se constituem em dispositivos semicondutores, “compostos por várias camadas de semicondutores dopados adequadamente, os quais emitem luz quando uma tensão é aplicada entre as camadas” (BAGNATO et al, 2008). Ainda são pouco utilizados em TFD, porém, estas fontes de luz possuem vantagens quando comparados ao laser e fibras ópticas, por exemplo, como serem mais baratos, de pequeno tamanho, leveza, flexibilidade (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007), luz monocromática (CARVALHO et al., 2009) e apresentam uma larga faixa de irradiação (RIBEIRO et al., 2009).

A Figura 8 apresenta a faixa de frequências que determina as cores para a luz (espectro de luz visível) em comprimento de onda dado em nm.

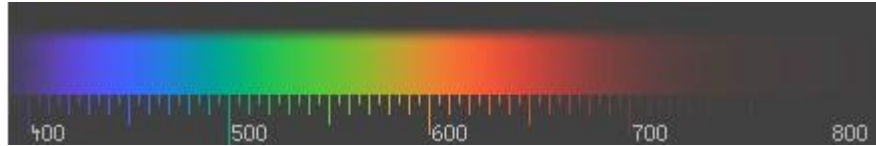


Figura 8: Espectro visível.
Fonte: CAVALHEIRO (2010).

Comercialmente os *LEDs* estão disponíveis em diversas cores: amarelo, alaranjado, azul, branco, verde e vermelho. A associação de diversos *LEDs*, em uma lâmpada, por exemplo, amplia a área de irradiação o que pode ser interessante para a terapia fotodinâmica.

2.7 CÉLULA BACTERIANA

As células bacterianas apresentam dimensões variáveis, com espessuras de 0,25 μm a 1,5 μm e comprimento de 1 μm a 10 μm . São seres unicelulares que estão presentes no ar, água e solo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; FUNKE, TORTORA; CASE, 2005). É de conhecimento comum que muitas bactérias são patogênicas causadoras de doenças aos seres humanos, outras produzem metabólitos que apresentam toxicidade para o homem. Entretanto, há bactérias que são benéficas atuando tanto dentro do organismo humano quanto sendo empregadas em fabricação de produtos como queijos e bebidas, por exemplo.

Esses microrganismos são procariontes e apresentam parede celular rígida em volta de membrana citoplasmática (PHILIPPI; ARONE, 1994). A composição diferenciada da parede celular das bactérias permite que haja classificação destas em gram positivas ou gram negativas. Bactérias gram negativas possuem composição química da parede celular mais complexa se comparadas às gram positivas, sendo que a parede externa das gram negativas possui barreiras adicionais à entrada de corantes, antibióticos, enzimas, lisozimas, sais de bile e enzimas digestivas (MÜLLER, 2006). Em seu envelope celular, as gram positivas têm somente uma membrana que é relativamente permeável (PERUSSI, 2007).

O gênero *Enterococcus* é composto de várias espécies que são habitantes do trato gastrointestinal, vagina e cavidade bucal sendo essa convivência por meio de relações harmônicas interespecíficas (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007). As

O grupo apresenta poucas exigências para crescimento, desenvolvendo-se em temperaturas que variam de 10 a 45 °C, sobrevivência a 60 °C por 30 minutos e crescimento a pH 9,6 em 6,5 % de solução salina (HÖRNER et al, 2005). O grupo é formado por microrganismos facultativos, catalase–negativos e a maioria das espécies hidrolisa esculina na presença de bile (PARADELLA; KOGA–ITO; JORGE, 2007).

Faz parte deste grupo a espécie *Enterococcus faecalis*, a qual se constitui de cocos gram positivos (Figura 9) “é relativamente frequente no solo e no meio ambiente em geral, inclusive no meio hospitalar” (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Podem causar septicemia, infecção do trato urinário, infecção das vias respiratórias assim como estão associados às infecções dentárias. Algumas das linhagens se apresentam ultra–resistentes (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

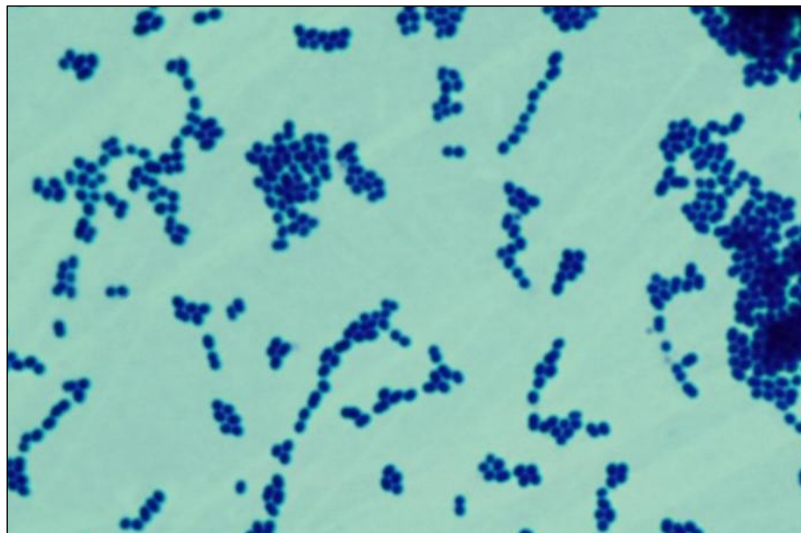


Figura 9: Cocos gram positivos de *Enterococcus faecalis*.
Fonte: Bacteria in Photos (2011).

3 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo proposto por este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia–DAQBI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná–UTFPR.

3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Os equipamentos utilizados no decorrer do trabalho e os laboratórios da UTFPR que os cederam para uso são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Equipamentos utilizados e os respectivos laboratórios fornecedores. (Continua)

EQUIPAMENTO	IDENTIFICAÇÃO	LABORATÓRIO
Autoclave	PHOENIX	Microbiologia
Balança analítica	OHAUS	Almoxarifado
Bomba para filtração	QUIMIS	Pesquisa
Espectrofotômetro	CARY 50	Pesquisa
Estufa	QUIMIS	Microbiologia
Fluxo laminar	PACHANE	Microbiologia
Geladeira	ELECTROLUX	Microbiologia
Lâmpada de LEDs vermelha	LLUM	Física

Tabela 1: Equipamentos utilizados e os respectivos laboratórios fornecedores. (Conclusão)

EQUIPAMENTO	IDENTIFICAÇÃO	LABORATÓRIO
Luxímetro	EXTECH	Física
Microondas	PANASONIC	Microbiologia
Potenciômetro	MICRONAL	Microbiologia
Vortex	BIOMIXER	Microbiologia

Vidrarias, meios de cultivo para microrganismos, membranas para filtração e demais materiais necessários foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia. Algumas vidrarias tiveram proveniência do Almoxarifado de Química da UTFPR.

Os fotossensibilizadores e o sistema de iluminação (lâmpadas e suportes) utilizados nos experimentos foram cedidos pelo DAFIS. A cepa liofilizada de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi adquirida com recursos próprios.

3.1.1 Identificação e preparo dos fotossensibilizadores

A Tabela 2 apresenta os dados dos recipientes contendo os FSs em pó utilizados no estudo.

Tabela 2: Fotossensibilizadores em pó e especificações do rótulo.

Fotossensibilizador	Marca	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Absorbância máxima (nm)
Azul de Metileno	Vetec	$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot XH_2O$	319,86 XH_2O	661 – 668
Azul de Toluidina	Vetec	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3SZn$	442,12	626 – 633
Verde Malaquita	Vetec	$C_{23}H_{25}N_2$	364,91	600 - 625

Os FSs foram preparados em solução salina 0,9% estéril com pH ajustado em torno de 7,0, filtrados em membrana de diâmetro de 47 mm e porosidade 0,45 μ m, protegidos da luz e armazenados sob refrigeração em torno 4°C, procedimentos adaptados de Rossoni et al. (2011).

3.2 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Foi adquirida a cepa liofilizada de *Enterococcus faecalis* proveniente da *American Type Culture Collection* - ATCC 29212 (New Prov) a qual foi reconstituída e ativada conforme instruções do fabricante. Foi realizado o esgotamento da suspensão bacteriana ativada em meio PCA (*Plate Count Agar*) e, na sequência, o cultivo ocorreu em 37 °C por 24 horas.

O meio contendo as colônias desenvolvidas foi armazenado sob refrigeração de até 4°C e foi empregado como estoque para utilização no estudo. Após 50-60 dias o estoque era substituído por estoques novos, a fim de que a cepa continuasse com suas características fisiológicas originais.

3.3 CONFIRMAÇÃO PRESUNTIVA DA ESPÉCIE

Realizou-se análise morfológica da colônia, teste de catalase e teste morfotintorial de gram para confirmação das características e pureza da espécie utilizada nos experimentos, conforme apostila de Cerqueira (2011) e manual de Lacaz-Ruiz (2000).

Para o teste morfotintorial de gram houve exame direto ao microscópio óptico (objetiva de 1000x) após preparo de material bacteriano, o qual consistiu de esfregaço, dessecação, fixação pelo calor e finalmente a coloração diferencial utilizando o método de coloração de gram.

3.4 INOCULAÇÃO BACTERIANA

Para utilização da cepa bacteriana nos experimentos foram coletadas duas UFCs (unidades formadoras de colônias) de placa de petri contendo cultura bacteriológica desenvolvida por 24h / 37°C (UFCs estoque mantidas a 4°C). As UFCs foram transferidas com auxílio de uma alça bacteriológica para tubo de

ensaio contendo 10 mL de meio *BHI* (*Brain Heart Infusion*) e incubou-se o mesmo a 37°C / 24h.

3.5 ESCOLHA DA MELHOR DILUIÇÃO BACTERIANA

Diluições sucessivas do inóculo foram necessárias para que houvesse possibilidade de quantificação das UFCs, conforme referência do Standard Methods (APHA, 2005). As diluições bacterianas foram efetuadas utilizando-se solução salina (s.s.) 0,9 % através da transferência de 1 mL de meio de cultivo desenvolvido em 10 mL de *BHI* (a 37°C / 24h) para tubo de ensaio contendo o volume de 9 mL de s.s. na concentração anteriormente apresentada, obtendo-se um volume de 10 mL, contendo uma diluição 1:10. A partir da solução diluída, era realizada uma nova transferência de volume. Seis diluições foram efetuadas. Todos os tubos de ensaio utilizados foram agitados em Vortex (BIOMIXER) e alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para meios *PCA*. Houve o espalhamento do volume depositado utilizando-se alça de Drigalski e posterior incubação das placas em estufa a 37°C / 24h e contagem. Para cada diluição, foram realizadas triplicata de placas.

O objetivo das diluições sucessivas foi a contagem segundo recomendação do Standard Methods com número de colônias entre 30 e 300. Na maioria das determinações de melhor diluição a diluição 10^{-5} se mostrou a mais adequada, desde que se fosse inoculado em *PCA* a alíquota de 0,05 mL ao invés de 0,1 mL.

3.6 ESPECTROSCOPIA

Os espectros de absorção dos fotossensibilizadores AM e AT dissolvidos em solução salina 0,9% na concentração de 10^{-5} mol/L foram obtidos em um espectrofotômetro Cary 50. Foi empregada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm para comportar a amostra. O gráfico gerado apresentou o comprimento de onda (λ) dado em nm no eixo X e a absorbância (unidades de

absorbância) no eixo Y. Os valores de comprimento de onda, apresentados no gráfico, são de 400 a 700 nm possibilitando a observação das bandas de absorção do AM e AT, conforme Prates (2005).

3.7 MEDIDAS DE ILUMINÂNCIA

De acordo com Luz (2011) o iluminamento ou iluminância é medido em lúmem por metro quadrado (Lm/m^2) e recebe o nome de lux. O iluminamento é a grandeza mais importante em todos os cálculos de iluminação e refere-se à intensidade luminosa por unidade de área. Então o iluminamento de uma superfície de 1m^2 proporcionado por uma fonte puntiforme posicionada 1 m de distância, na direção normal, uniformemente distribuído, corresponde a um lux.

As medidas de iluminância da lâmpada de *LEDs* utilizada foram efetuadas utilizando-se um luxímetro (EXTECH).

3.8 TESTES DE TOXICIDADE DOS FSs

Diferentes concentrações de FSs foram testadas a fim de que se avaliasse a toxicidade microbiana em relação ao grupo controle (grupo que não recebeu irradiação nem FS), através do contato com o corante em solução, na ausência de fonte luminosa.

Após a obtenção da diluição do inóculo (10^{-5}) pipetou-se 1 mL da suspensão bacteriana em cinco tubos de ensaio com tampa. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 1 mL das concentrações de FSs variadas. O volume final da composição FS + solução bacteriana foi de 2 mL. Houve o preparo de um tubo controle ao qual foi adicionado 1 mL de s.s. 0,9 % em substituição a solução de FS.

O tempo de contato do FS com a solução bacteriana foi de 15 minutos (BENVINDO et al., 2008). Nesse período os tubos permaneceram no escuro. Posteriormente alíquotas de 0,05 mL de cada amostra foram depositadas em PCA

para que se realizasse o espalhamento com alça de Drigalski. O estudo foi efetuado em triplicata, sendo as placas embaladas em papel kraft, incubadas a 37°C / 24h e as UFCs contadas (Figura 10).

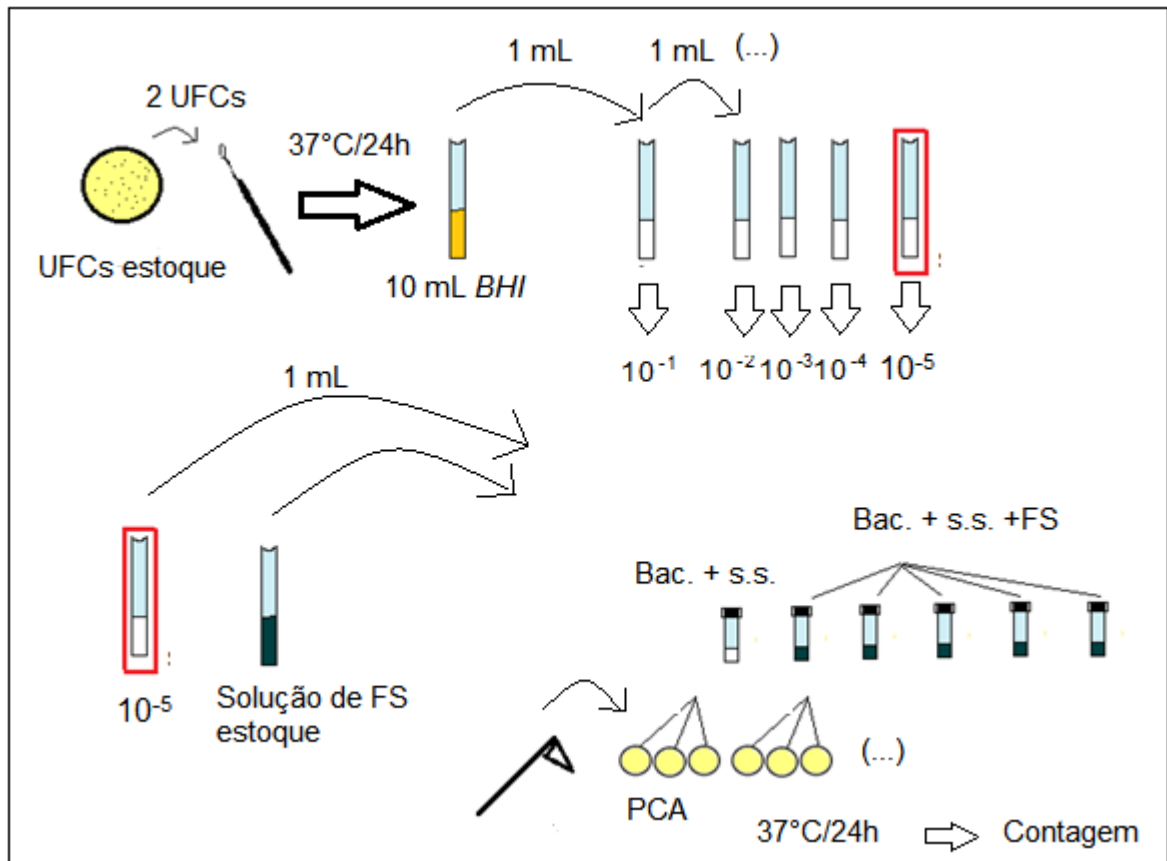


Figura 10: Teste de toxicidade.
Fonte: Autoria própria.

No decorrer dos testes, a concentração final dos FSs AM e AT a $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L foi escolhida para os testes de fototoxicidade.

3.9 TESTES DE FOTOTOXICIDADE DOS FSs

Para este trabalho utilizou-se uma lâmpada de *LED* comercial de alto brilho que emite luz na faixa do vermelho, composta de 36 *LEDs* internos e potência máxima de 1,5 W (Figura 11).



Figura 11: Lâmpada de LEDs vermelha utilizada.
Fonte: Autoria própria.

Para obtenção dos resultados do teste de fototoxicidade, realizou-se triplicata do mesmo, ou seja, três análises, mantendo-se as variáveis analisadas nas mesmas condições. Os grupos testados no experimento de fototoxicidade se diferenciaram de acordo com a presença ou ausência de FS e luz, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Condições experimentais dos grupos testados.

Grupo	Condições experimentais
$L^- + FS^-$	Ausência de fonte luminosa e Ausência de fotossensibilizador
$L^+ + FS^-$	Presença de fonte luminosa e Ausência de fotossensibilizador
$L^- + FS^+$	Ausência de fonte luminosa e Presença de fotossensibilizador
$L^+ + FS^+$	Presença de fonte luminosa e Presença de fotossensibilizador, tempo de irradiação t1
$L^+ + FS^+$	Presença de fonte luminosa e Presença de fotossensibilizador, tempo de irradiação t2
$L^+ + FS^+$	Presença de fonte luminosa e Presença de fotossensibilizador, tempo de irradiação t3

As amostras foram irradiadas em placa de microtitulação de 96 poços. O volume irradiado continha 0,1 mL de amostra. Cada poço possuía a capacidade volumétrica de 0,2 mL. Para comportar a lâmpada, utilizou-se um suporte de madeira. Houve três tempos de irradiação (t1, t2 e t3). Para cada tempo, irradiou-se simultaneamente 3 poços contendo a amostra. Os grupos controle $L^- + FS^-$ e $L^- + FS^+$ não sofreram irradiação.

O procedimento dos testes de fototoxicidade é continuação dos testes de toxicidade, ou seja, após a definição de concentração e volume de FS foram

realizados experimentos de TFD empregando como fonte de luz uma lâmpada de LEDs vermelha (potencial nominal de 1,5 W).

Os testes de fototoxicidade consistiram nas etapas descritas a seguir e ilustradas na Figura 12.

- Transferência de duas UFCs provenientes da placa de petri contendo UFCs estoque, com auxílio de alça de inoculação, para tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo *BHI* e incubação a 37°C / 24h;
- Diluições sucessivas em salina 0,9% do meio *BHI* desenvolvido até 10^{-5} (suspensão estoque);
- Transferência de 1 mL de suspensão estoque para seis tubos com tampa;
- Passagem de 0,5 mL de FS para quatro tubos com tampa;
- Complementação do conteúdo dos frascos de tampa com solução salina 0,9%, a fim de que o volume final atingisse 2 mL. O tempo de pré-irradiação dos tubos que receberam FS foi de 15 minutos, para tanto, os frascos foram protegidos da luz;
- Passagem de 0,1 mL das amostras a serem irradiadas para 3 poços de placa de microtitulação;
- Irradiação das amostras por três tempos distintos, exceto os grupos controle ($L^- + FS^-$) e ($L^- + FS^+$). Após o tempo de irradiação, houve a transferência do volume de 0,05 mL de cada poço da placa de microtitulação para cada uma das três placas de petri contendo meio *PCA*. Para cada tempo de irradiação distinto, houve triplicata de placas de petri;
- Espalhamento do inóculo com auxílio de alça de Drigalski;
- Incubação das placas de petri utilizadas a 37°C / 24h protegidas da luz por envoltórios de papel kraft e contagem das UFCs.

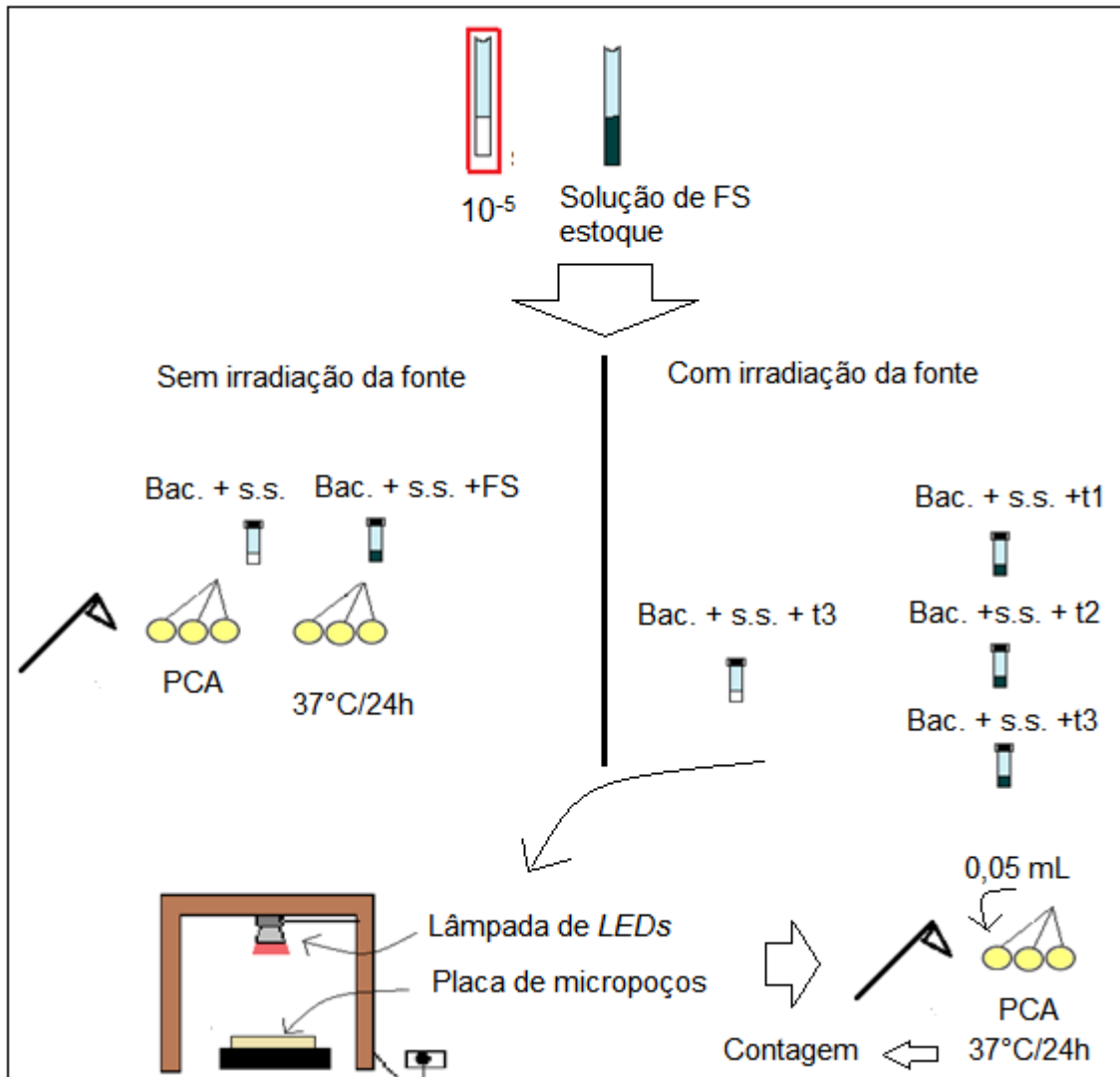


Figura 12: Teste de fototoxicidade.
Fonte: Autoria própria.

Foram testadas diferentes distâncias entre a fonte de luz e a amostra, assim como diferentes tempos de irradiação.

A Tabela 4 apresenta os volumes e concentrações finais depositados nos tubos com tampa conforme o grupo experimental.

Tabela 4: Volumes e concentrações de fotossensibilizadores depositados em tubos com tampa.

V de SE (mL)	V de FS (mL)	V de S.S. (mL)	V _f (mL)	C _f de FS (mol/L)	Grupo
1	0,0	1	2	0	L ⁻ + FS ⁻
1	0,0	1	2	0	L ⁺ + FS ⁻
1	0,5	0,5	2	0,00025	L ⁻ + FS ⁺
1	0,5	0,5	2	0,00025	L ⁺ (t1) + FS ⁺
1	0,5	0,5	2	0,00025	L ⁺ (t2) + FS ⁺
1	0,5	0,5	2	0,00025	L ⁺ (t3) + FS ⁺

Legenda: V de SE: volume de suspensão estoque bacteriana; V de FS: volume de fotossensibilizador; V de S.S.: volume de solução salina; V_f: volume final (fotossensibilizador + solução salina + suspensão estoque bacteriana); C_f de FS: Concentração final de fotossensibilizador.

No decorrer dos estudos, a distância entre a fonte de luz e a amostra foi padronizada em 1,2 cm e os tempos de irradiação de 15 s, 30 s e 60 s foram os períodos considerados para comparação e discussão dos resultados fotodinâmicos de cada FS.

A Figura 13 ilustra o sistema utilizado com as medidas em centímetros de altura e largura internas do suporte de madeira, utilizado para comportar a lâmpada de LEDs, altura do suporte da placa de microtitulação, utilizado para situar a placa mais perto da lâmpada e medidas da placa de microtitulação como altura total, altura do micropoço, altura do volume contido no micropoço e diâmetro do micropoço para irradiação das amostras.

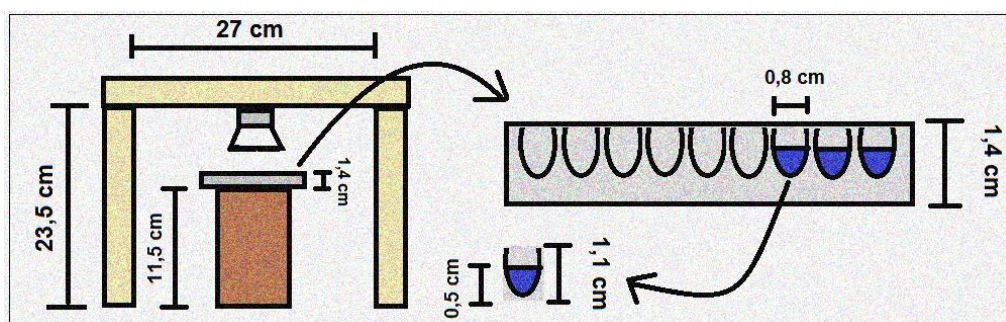


Figura 13: Dimensões do sistema utilizado para irradiar as amostras. Em detalhe, as medidas da placa de microtitulação.
Fonte: Autoria própria.

A Figura 14 apresenta a foto do sistema utilizado (suporte de madeira, lâmpada de *LEDs* vermelha e a placa de microtitulação de 96 poços utilizada). Ao lado dessa foto está a placa de microtitulação.

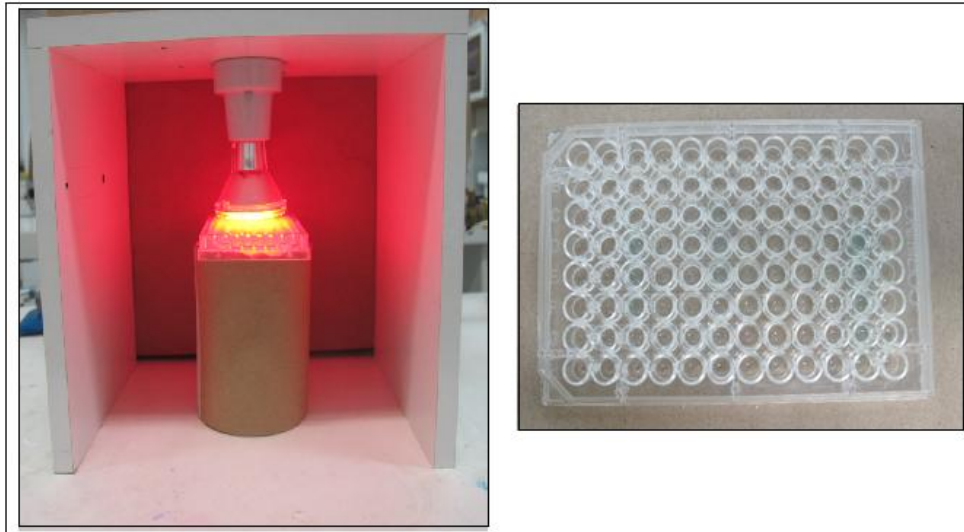


Figura 14: Suporte de madeira com lâmpada de *LEDs* irradiando placa de microtitulação. Na foto do lado direito observa-se placa de microtitulação de 96 poços.

3.10 RESÍDUOS GERADOS

Ao final de cada experimento, os resíduos e materiais (como meios de cultivo, solução salina, FS e vidraria em geral) eram encaminhados para autoclave (121°C / 30 minutos) para desinfecção. Posteriormente, as vidrarias eram lavadas e secas. Os resíduos de meios de cultivo, como o *PCA*, eram depositados em recipientes para material orgânico.

Resíduos de corantes produzidos no decorrer do estudo foram armazenados em embalagens de plástico para posterior submissão a tratamento ou destinação final mais adequada possível, sendo a empresa responsável para tanto, contratada pela UTFPR.

4 RESULTADOS OBTIDOS E ANÁLISE

4.1 TESTES PRESUNTIVOS PARA *Enterococcus faecalis*

Na análise morfológica as colônias apresentaram as seguintes características: dimensão reduzida; elevação convexa; forma puntiforme e margem lisa. O teste da catalase resultou em ausência de bolhas. O teste morfotintorial de gram procedeu em cocos gram positivos. Todos os resultados concordaram com o Manual de Bergey (1994).

A Figura 15 ilustra uma placa de petri contendo colônias de *Enterococcus faecalis* em meio PCA com crescimento de 24 h.

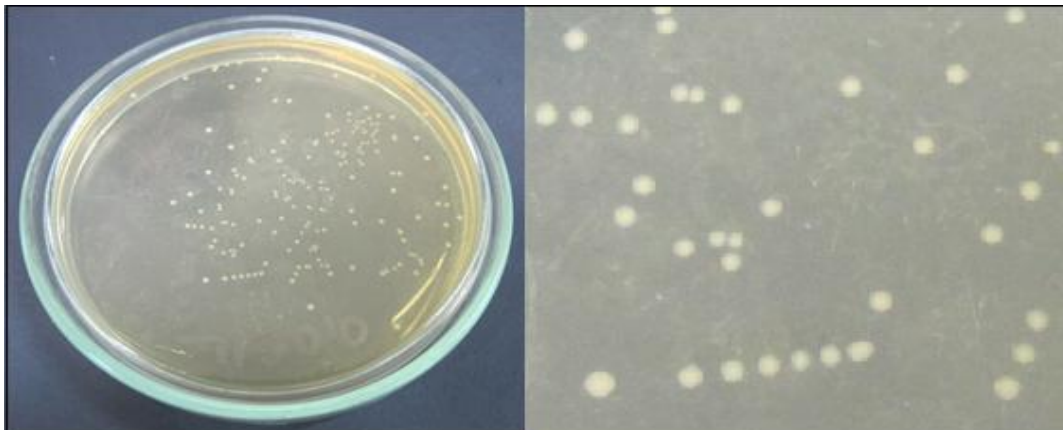


Figura 15: Colônias de *Enterococcus faecalis* com crescimento de 24h em meio PCA.

Fonte: Autoria própria.

4.2 DIFERENÇAS ESPECTROSCÓPICAS DOS CORANTES AZUL DE METILENO E AZUL DE TOLUIDINA

A Figura 16 ilustra a espectroscopia de absorção óptica dos FSs AM e AT em solução salina 0,9%, ambos na concentração de 5×10^{-5} mol/L. A varredura do

espectro se situou na faixa de comprimento de onda de 400 a 700 nm, conforme Prates (2005) a fim de se observar as bandas de absorção dos dois corantes.

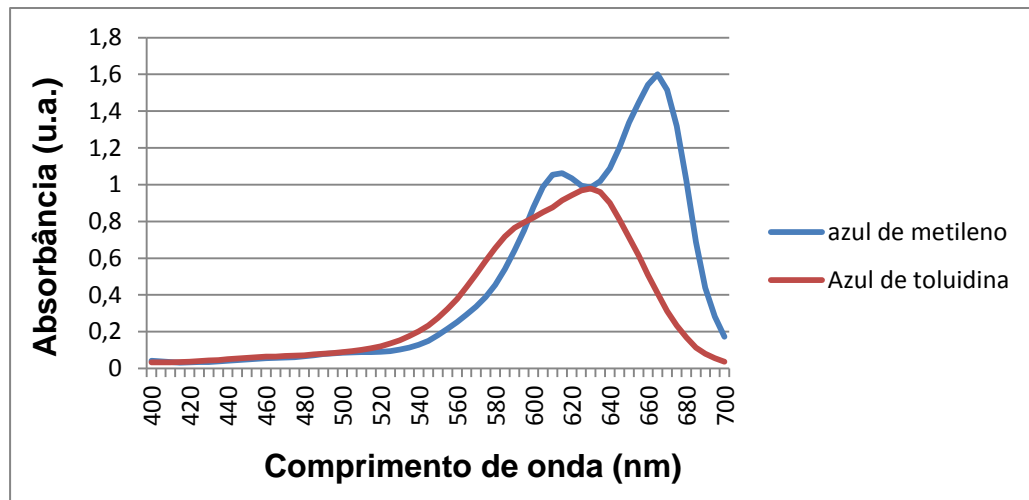


Figura 16: Espectros de absorção óptica dos fotossensibilizadores AM e AT nas concentrações de 5×10^{-5} mol/L em solução salina 0,9%.

O azul de metileno apresentou dois picos de absorção espectral acentuados (665 nm e 615 nm), enquanto que o FS azul de toluidina exibiu um pico de absorção mais evidente em 630 nm. O gráfico obtido está de acordo com a especificação do rótulo dos produtos (VETEC). Os comprimentos de onda (nm) dos dois fotossensibilizadores se situam na faixa do vermelho do espectro visível, conforme Figura 6. Essa faixa é ressonante com a fonte de luz utilizada, compatibilidade que é “fundamental para que os efeitos fotofísicos e fotoquímicos ocorram” (PRATES, 2005).

4.3 MEDIDAS DE ILUMINÂNCIA

Para determinação da iluminância (lux) da lâmpada em estudo avaliou-se três setores (áreas) da superfície da fonte a fim de se observarem suas variações no decorrer do tempo conforme Figura 17. A área de número 2 era a região onde se postava a placa de micropoços localizando as amostras na região central da lâmpada de LEDs.

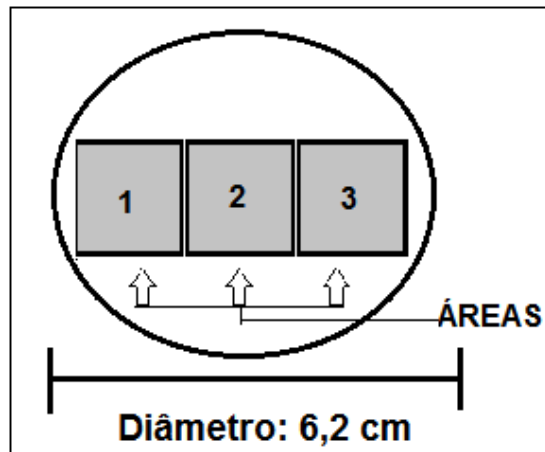


Figura 17: Áreas da superfície da lâmpada que sofreram medição de iluminância

Para cada setor (1, 2 e 3) foram realizadas medidas de iluminância em três tempos distintos: 1 minuto, 5 minutos e 10 minutos. A Tabela 5 ilustra as médias das medidas observadas e os desvios – padrões para cada setor avaliado. As medições foram efetuadas com luxímetro (EXTECH) aproximadamente à mesma distância em que se irradiavam as amostras nos experimentos de fototoxicidade.

Tabela 5: Médias de iluminância em lux para os setores 1, 2 e 3.

SETOR	MÉDIA (lux)	DESVIO – PADRÃO (\pm)
1	9430	402
2	15220	283
3	9870	80

De acordo com as medidas efetuadas, os maiores valores foram obtidos na região central da lâmpada (área 2) comparadas às bordas (área 1 e 3) da superfície da lâmpada. Durante os experimentos a placa de micropoços foi posicionada de forma que os três poços utilizados estivessem na região de maior iluminância.

4.4 COMPARAÇÃO DA REDUÇÃO MICROBANA ENTRE AZUL DE METILENO E AZUL DE TOLUIDINA

4.4.1 Densidades de energia

A densidade de energia calculada para os três tempos de irradiação utilizando a equação para cálculo de densidade de energia (Figura 7) é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6: Densidades de energia (J/cm^2) calculadas para cada tempo de irradiação (s) considerando-se a potência da lâmpada (W) e a área (cm^2) de cada micropoço irradiada.

Tempo (s)	Potência (W)	Área (cm^2)	Densidade de energia (J/cm^2)
15	1,5	0,5026	44,7
30	1,5	0,5026	89,5
60	1,5	0,5026	179,0

4.4.2 Comparação entre FSs

A fotossensibilização do AM e AT nas concentrações de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L por lâmpada de diodo emissor de luz de potência 1,5 W, nos tempos de irradiação de 15, 30 e 60 s promoveu redução na porcentagem de células viáveis.

A Tabela 7 apresenta as porcentagens de inibição bacteriana, com os respectivos desvios-padrões dos grupos experimentais (com exceção de $L^- + FS^-$) de acordo com o tipo, presença ou não de FS (azul de metileno e azul de toluidina) e em relação ao tempo de irradiação. A tabela também mostra os valores calculados para a densidade de energia aplicada por unidade de área. Essa tabela expõe valores de inibição em comparação ao grupo $L^- + FS^-$, ou seja, este grupo foi considerado como referência de UFCs para comparação de taxa de inibição com os demais.

Tabela 7: Porcentagens de inibição (%) com desvios-padrão dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina obtidas em relação ao grupo L⁻ + FS⁻ de cada corante.

Grupo	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm ²)	Porcentagem de inibição (%)	
			AM	AT
L ⁻ + FS ⁻	0	0	-	-
L ⁺ + FS ⁻	60	179,0	17,9 ± 21,4	8,8 ± 3,2
L ⁻ + FS ⁺	0	0	47,9 ± 14,5	7,8 ± 29,1
L ⁺ + FS ⁺	15	44,7	85,1 ± 14,4	8,0 ± 22,5
L ⁺ + FS ⁺	30	89,5	97,6 ± 2,7	32,7 ± 15,7
L ⁺ + FS ⁺	60	179,0	98,9 ± 0,2	61,2 ± 17,1

O grupo L⁺ + FS⁻ apresentou média de porcentagem de inibição para ambos os FSs, AM (17,9 ± 21,4%) e AT (8,8 ± 3,2%), indicando que a lâmpada apresentou algum efeito bactericida. Não houve diferenças significativas entre o grupo analisado para ambos os FSs. De acordo com Benvindo et al. (2008) há pesquisas que apontam para resultados que convergem para efeitos estimulantes ou inibitórios dos organismos testados com fontes de luz tais como o *LASER*. Segundo esses estudos (KAWAMOTO et al., 2000) os resultados são decorrentes das modificações geradas pelo aumento do aporte energético fornecido pela fonte de luz na cadeia respiratória das bactérias.

Os grupos L⁻ + FS⁺ de ambos FSs não exibiram porcentagens de inibição microbiana significativamente diferente, concordando com Demidova; Hamblin (2005) já que apresentam estrutura química e propriedades físico-químicas parecidas. Segundo estudos de Usacheva; Teichert; Biel³ (2001 apud Marinho, 2006) o AT apresenta maior solubilidade em regiões da membrana, possibilitando maior concentração do FS no interior da célula o que lhe confere maior efeito bactericida, porém no presente estudo o efeito antimicrobiano de ambos FSs foram semelhantes.

Esse resultado diverge da literatura que, em geral, afirma que o FS indicado para TFD seja atóxico na ausência de fonte luminosa. Estudos de Müller (2006) apontam que o AM, na concentração de 5,34 µM também foi eficaz na redução microbiana de *Enterococcus faecalis* na ausência de radiação. Núñez (2007)

comenta sobre a dificuldade de estabelecer comparativos entre FSs uma vez que, sempre ocorre desacordo nos estudos envolvendo estes FSs.

Os grupos utilizados nos testes de irradiação ($L^+ + FS^+$) de ambos os FSs apresentaram redução em relação ao grupo controle $L^- + FS^-$ nos três tempos de irradiação empregados, concordando com Souza (2009) que, em estudo para avaliação da eficácia adicional da TFD para tratamentos dentários concluiu que os FSs AM e AT, ambos a $15\mu\text{g/mL}$, associados a um *LASER* foram efetivos contra *Enterococcus faecalis*.

Contudo o AM se sobressaiu na taxa de redução microbiana, sendo mais eficiente que o AT em todos os tempos. Em 60 s de irradiação o AM atingiu uma média de inibição de $98,9 \pm 0,2\%$ enquanto que o AT inibiu $61,2\% \pm 17,1$. Isso sugere que apesar dos dois FSs agirem de forma semelhante, a maior redução microbiana apresentada pelo corante AM pode estar relacionado com a maior compatibilidade com o λ emitido pela lâmpada de *LEDs* gerando um efeito fotodinâmico mais significativo. Esse FS (AM) possui dois picos de absorção expressivos, comparado ao AT o qual possui somente uma banda mais acentuada.

De acordo com Núñez (2007) muitos fatores contribuem para diferenças de efetividade microbiana dos FSs AM e AT tais como as defesas antioxidantes de cada microrganismo, localização subcelular do composto e sua interação com o meio. A Figura 18 compara, através de gráfico de colunas, as porcentagens de inibição bacteriana dos FSs azul de metileno e azul de toluidina de acordo com as densidades de energia aplicadas.

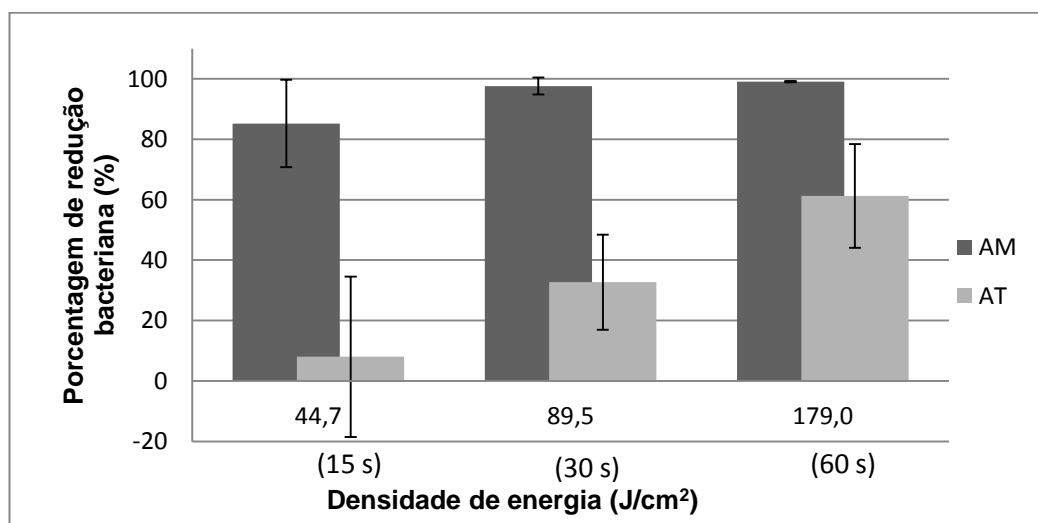


Figura 18: Gráfico comparativo entre AM e AT de acordo com a porcentagem de inibição (%) e densidade de energia aplicada (J/cm^2). As barras verticais representam os desvios-padrões das médias de redução.

Observa-se que além do AM apresentar resultados de eficiência maiores que o AT, ainda possui menor variação das médias de redução (erro-padrão). A taxa de inibição bacteriana é maior conforme o aumento da densidade de energia aplicada para os dois FSs testados. O aumento do tempo de irradiação proporcionou maior fotodestruição dos microrganismos, estando de acordo com os estudos de Usacheva; Teichert; Biel (2001)³. O AM nos três tempos de irradiação não apresentou diferenças significativas entre eles apontando grande eficiência fotodinâmica mesmo no menor tempo de irradiação (15 s). O FS AT não apresentou diferenças significativas entre os tempos de irradiação de 30 s e 60 s, além disso, o tempo de irradiação máximo (60 s) do FS AT não apresentou efeitos significativamente maiores que o tempo mínimo (15 s) do AM, indicando que este, foi eficaz em menos tempo.

4.5 OUTROS TESTES REALIZADOS

Rossoni et al. (2011) em estudo utilizando VM a 0,1% associado a um *LASER* de baixa intensidade concluíram que o VM foi eficaz contra *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* tanto na presença de fonte de luz quanto na ausência. Prates (2005) avaliou o potencial do FS VM a 0,01% contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* utilizando *LASER* e concluiu que a associação apresentou grande potencial para utilização em TFD. Rossoni et al. (2008) avaliaram o potencial de três fotossensibilizadores AM, AT e VM associados a um *LASER* sobre *Candida albicans* e concluíram que todos os FSs foram eficazes contra a espécie.

Apesar da existência de estudos apontando o grande potencial do FS VM contra microrganismos tais como bactérias e fungos, o presente trabalho não obteve resultados satisfatórios devido ao alto tempo de irradiação exigido pelo corante para a ocorrência de efeitos citotóxicos nas células bacterianas, utilizando lâmpada de *LED* 1,5 W (fonte de luz empregada neste trabalho).

O FS verde malaquita ($\lambda_{\text{máx.}} = 625 \text{ nm}$), na concentração final de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, passou por testes de fototoxicidade inicialmente, utilizando *Enterococcus faecalis*.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos no experimento que envolvia as mesmas condições utilizadas para AM e AT, exceto a concentração os tempos de irradiação, os quais se constituíram de 30, 40 e 50 minutos. Foi realizado somente um teste nas condições citadas para o FS e, portanto não houve triplicata do experimento, somente triplicata das placas de petri para cada grupo testado.

Tabela 8: Porcentagens de inibição (%) do fotossensibilizador verde malaquita obtidas em relação ao grupo $L^- + FS^-$ levando-se em consideração o tempo de irradiação com lâmpada de LEDs 1,5 W.

Grupo	Tempo de irradiação (minutos)	Porcentagem de inibição (%)
$L^- + FS^-$	0	-
$L^+ + FS^-$	50	42,6
$L^- + FS^+$	0	41,1
$L^+ + FS^+$	30	43,9
$L^+ + FS^+$	40	53,9
$L^+ + FS^+$	50	71,7

Os resultados da Tabela 8 indicam que o FS verde malaquita, nas condições do experimento, requereu muito tempo de irradiação para proporcionar inibição das bacterianas de *Enterococcus faecalis*. Esse fotossensibilizador apresentou desempenho inferior, comparado aos FSs AM e AT.

Foram testadas outras fontes de luz com maior potência utilizando como FS o VM, como lâmpadas de LEDs (de 3 W e 6 W), laser (<5 mW e 20 mW) e lâmpada incandescente (de 200 W) a fim de que se observasse eficiência de inibição mais alta e com menor tempo de irradiação, entretanto, nenhuma das fontes de luz testadas ofereceu resultados rápidos comparados aos outros dois corantes testados (AM e AT), com exceção da lâmpada incandescente, que apresentou faixas de inibição acentuadas, entretanto, os resultados não foram considerados devido aos efeitos térmicos aditivos dessa fonte de luz.

Além das diferentes fontes de luz testadas, a concentração de FS, distância da amostra da fonte luz, dentre outros parâmetros, foram avaliados a fim de se

conseguir resultados eficientes. Portanto, concluiu-se que as fontes de luz utilizadas não tiveram banda ressonante compatível com o FS VM.

4.6 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Houve dificuldades em relação a obter número de colônias adequado, ou seja, entre 30 e 300 UFCs, o que ocasionou a perda de diversos experimentos. Foi necessário estabelecer um rigoroso controle do tempo de estocagem das placas de petri, alterando todo o planejamento dos experimentos. Isso ocorreu porque foi observado que a quantificação ficava comprometida quando se utilizava *PCA* contido nas placas de petri de “tempo de vida” menor que 3 dias. Ou seja, após o preparo do ágar, plaqueamento do mesmo e armazenamento sob refrigeração de 4 °C, a utilização do mesmo em intervalos de tempo inferiores à três dias resultava em aglomerações de UFCs na placa de petri, dificultando ou impossibilitando a contagem.

A maior dificuldade do trabalho foi o desvio nos resultados dos diferentes experimentos. Uma possível solução seria utilizar métodos alternativos de padronização do inóculo como a liofilização, construção de curva de calibração ou utilização da escala Mcfarland.

5 CONCLUSÕES

A fonte luminosa e os pigmentos isolados apresentaram efeito bactericida sobre as culturas de *Enterococcus faecalis*.

Os fotossensibilizantes azul de metileno e azul de toluidina apresentaram potencial para serem aplicados em terapia fotodinâmica antimicrobiana por reduzirem as UFCs viáveis quando associados à uma lâmpada de LEDs vermelha.

O pigmento azul de metileno se mostrou superior em eficiência bactericida comparado ao azul de toluidina, na presença de radiação luminosa. O corante verde malaquita não exibiu resultados fotodinâmicos eficientes comparado aos corantes azul de metileno e azul de toluidina nas condições testadas.

Uma vantagem da TFD é que ela pode ser aplicada inúmeras vezes, visando controlar a presença de microorganismos, especialmente com o objetivo de desinfecção de ambientes. Há também a questão do custo com fontes de luz e fotossensibilizadores baratos, esse tipo de tratamento passa a ser economicamente viável. Assim sendo, a ação fotodinâmica antimicrobiana é um campo promissor que necessita de maior número de estudos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da ação fotodinâmica antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* utilizando concentrações inferiores de FSs às citadas neste estudo;
- Repetição dos experimentos em números maiores que triplicatas;
- Avaliação da redução microbiana de bactérias gram negativas;
- Provas bioquímicas com as colônias sobreviventes;
- Irradiação de amostras com volume maior e/ou em outros recipientes;
- Desenvolvimento de método visando a retirada dos corantes da água.
- Novos testes com fontes diferentes com maior potência (LEDs ou LASER);
- Outros microorganismos poderiam ser contemplados, fungos, por exemplo;
- Uso de outras substâncias como fotossensibilizadores.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, Cristiane F.; SANTOS, Mariane F. L.; TAKEHARA, Graziela N. M.; PAULA, Marcos V. Q. de. **Rev. Bras. Odontol.** Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 68–71, 2011.

AMARAL, Rodrigo R.; AMORIM, José C. F.; NUNES, Eduardo; SOARES, Janir A.; SILVEIRA, Frank F. Terapia fotodinâmica na endodontia–revisão de literatura. **Revista de Odontologia**, v. 15, n. 2, p. 207–211, 2010.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, USA, 2005.

BACTÉRIA. BACTERIA IN PHOTOS, 2011. Disponível em: <
<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>>

BAGNATO, Vanderlei S.; INADA, Natalia M.; FONTANA, Raquel F.; TEDESCO, Antonio C.; RASTELLI, Alessandra N. de S.; JACOMASSI, Denis P.; KURACHI, Cristina; FERREIRA, Juliana; Filho, José D. V.; MENEZES, Priscila F. C.; PAVARINA, Ana C.; MIMA, Ewerton G. de O.; DOVIGO, L. N.; GIUSTE, Juçaira; PERUSSI, Janice R.; IMASATO, Hidetake; LIZARELLI, Rosane de F. Z.; MACIEL, Vitória; SILVA, O. de C. e; SANKARANKUTTY, Ajith K.; ZUCOLOTO, Sérgio. **Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde**. 1. ed. São Paulo: Livraria da Física: 2008.

BAPTISTA, Alessandra. **Efeito da Terapia Fotodinâmica na Doença Cárie. Estudo In Vivo**. 2009, 45 f. Dissertação (mestrado em lasers em odontologia)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BENVINDO, Rogério G.; BRAUN, Graziela; CARVALHO, Alberito R. de; BERTOLINI, Gladson R. F. Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de

baixa potência em bactérias *in vitro*. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, n. 1, p. 53–57, 2008.

CARVALHO, Juliana M.; FLORES, Carlos A. T.; FREITAS, Josiane da S.; GIARETTA, Vania M. de A.; SANT'ANNA, Ana L. G. G.; POSSO, Maria B. S. Aplicação do diodo emissor de luz infravermelha no tratamento da dor fibromiálgica. **Rev. Dor**. São José dos Campos, v. 10, n. 4, p. 331–336, 2009.

CAVALHEIRO, Flavia M. **Avaliação da Redução Microbiana em Conduitos Radiculares Contaminados Comparando Três Técnicas de Irradiação com Laser de Baixa Potência Associado a Fotossensibilizador**. 2007, 44 f. Dissertação (mestrado em Lasers em Odontologia)-Pesquisas Energéticas e Nucleares- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CAVALHEIRO, Carlos A. INFO ESCOLA, 2010. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/fisica/espectro-visivel/>>

CERQUEIRA, Aloysio. **Apostila de aulas práticas**. Universidade Federal Fluminense. Disponível em: <http://www.uff.br/labac/Apostila_Pratica_Farm-Odonto.pdf> Acesso em 13 de nov. 2011.

DEMIDOVA, Tatiana; HAMBLIN, Michael R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. **American Society for Microbiology**. V. 71, n. 11, p 6918-6925, 2005.

FUNKE, Berdell R.; TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: 2005.

GARCEZ, Aguinaldo. S.; RIBEIRO, Martha. S.; TEGOS, George P.; NÚÑEZ, Silvia C.; Jorge, ANTONIO O. C.; HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med**. 2007; 39: 59-66.

GOMES, Valder Barboza. **Atividade Antimicrobiana da Radiação Laser Nd:Yag, Frente a Anaeróbios do Sistema de Canais Radiculares: Estudo *In Vitro***. 2003, 79 f. Dissertação (mestrado em Odontologia)-Departamento de Prótese e Cirurgia,

Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

GONZALES, Fernanda P.; **Triagem, identificação e determinação de parâmetros funcionais de fotossensibilizadores com ação antifúngica**. 2007. 110 p. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP–Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia, Ribeirão Preto, 2007.

HOLT, John G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

HÖRNER, Rosmari; LISCANO, Mari, G. H.; MARASCHIN, Mariane de M.; SALLA, Adenilde; MENEGHETTI, Bettina; FORNO, Nara L. F. D.; RIGHI, Roselene A.; Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. v.25, 2006.

KAWAMOTO, K.; SENDA, N.; SHIMADA, K.; ITOL, K.; HIRANO, Y.; MURAI, S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. **Lasers Med Sci**. v 15, p. 257-262, 2000.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**. v. 86, n. 8, p. 694 – 1126, 2007.

LACAZ–RUIZ, Rogério. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. Disponível em:

LEITE, Breno T.; ROBAINA, Nicolle F.; CASSELLA, Ricardo J.; Estudo da remoção do corante catiônico verde de malaquita em meio aquoso empregando espumas de poliuretano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31. 2011. **Sociedade Brasileira de Química**.

LUZ, Jeanine M. da. Luminotécnica. 2011.

MACHADO, Antonio E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, Uberlândia, v. 23, n. 2, jul. 2000.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARINHO, Sandra A. **Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* E de células epiteliais: estudo *in vitro***. 2006, 161 f. Dissertação (Doutorado em Estomatologia Clínica)–Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

MAROTTI, Juliana. **Descontaminação da Superfície de Implantes Dentários por meio da Terapia Fotodinâmica**. 2008, 119 f. Dissertação (mestre em prótese dentária)–Universidade de São Paulo–Faculdade de Odontologia–Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. São Paulo, 2008.

MORI, Mariana; CASSELLA, Ricardo J.; Estudo da sorção do corante catiônico violeta cristal por espuma de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio. **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2009.

MÜLLER, Frederico. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias Gram – positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizadores**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

NÚÑEZ, Silvia C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto – toluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007. 127 p. Tese (Doutorado)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares–Autarquia associada à Universidade de São Paulo. 2007.

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

OLIVEIRA, Anna Paula A. de; PINHEIRO, Sérgio L. Avaliação da capacidade de redução microbiana do fotossensibilizante azul de toluidina irradiado com laser de baixa intensidade em lesões de cáries dentinárias. In: I ENCONTRO DE INICIAÇÃO

EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO DA PUC–CAMPINAS, 1. 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: PUC , 2011.

PAOLI, Vania M. **Terapia Fotodinâmica Aplicada à Erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*: Avaliação *In Vitro* da Eficiência de Diferentes Fármacos Fotossensíveis.** 2005, 162 f. Tese (doutorado em ciências, área Química)–Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto–Departamento de Química–Programa de Pós-Graduação em Química, Ribeirão Preto, São Paulo, 2005.

PARADELLA, Thaís C.; KOGA–ITO, Cristiane Y.; JORGE, Antônio O. C.; Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, 2007, v. 36, n. 2, p. 163–168.

Odontologia da UNESP, São Paulo, 2007, v. 36, n. 2, p. 163–168.

PASCHOAL, Marco A. **Avaliação *in vitro* dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre Microrganismos Cariogênicos Presentes na Saliva de Crianças.** 2009, 141 f. Dissertação (mestrado em Odontologia) –Faculdade de Bauru–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PERUSSI, Janisse R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, São Carlos, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PHILIPPI, Maria L. dos S.; ARONE, Evanisa M. **Enfermagem em doenças transmissíveis.** 11 ed. São Paulo: Senac, 1994.

PINTO, Rafael A.; COSETIN, Marcelo R.; MARCHESAN, Tiago B.; CAMPOS, Alexandre; PRADO, Ricardo N. do. Lâmpada compacta empregando LEDs de alto-brilho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AUTOMÁTICA - CBA, 2008.

PRATES, Renato A.; **Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo in-vitro.** 2005. 37 p. Dissertação (Mestrado em *Laser* e Odontologia)–Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PRATES, Renato A.; SILVA, Enriques G. da; SUZUKI, Luis C.; PAULA, Claudete R.; RIBEIRO, Martha S. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, São Paulo, v.4, n. 1, p. 53-57, 2010.

RAMOS, André L. O.; SOUSA, Marcelo V. P.; YOSHIMURA, Elisabeth M. Validação de simulação de Monte Carlo para estudo da distribuição de luz em tecidos biológicos. **Revista Brasileira de Física Médica**. v. 4, n. 1, p. 59–62, 2010.

RIBEIRO, Araceli V. F. N.; SILVA, André R. da; NOVAES, Gabriela P.; BELISÁRIO, Marciela; JORGE, Renato A.; RIBEIRO, Joselito N. Substâncias ativadas pela luz: potentes armas na batalha contra o câncer. **InterSciencePlace**. América do Norte, p. 1–15, 2009.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A. Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesityporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível. **Eclética Química**, São Paulo, v. 30, n. 1, 2005.

ROSSONI, Rodnei D.; JUNQUEIRA, Juliana C.; SOUZA, Rodrigo C. de; PEREIRA, Cristiane A.; JORGE, Antônio O. C. **Comparação da eficácia fotodinâmica do azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita contra *Candida albicans***. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. 2011.

ROSSONI, R. D.; RIBEIRO, M. A.; BARBOSA, J. O.; JORGE A. O. C.; JUNQUEIRA, J.C. Efeitos bactericidas do verde malaquita e azuleno associados ao laser de baixa intensidade sobre *Enterobacteriaceae*. In: XII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO – UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA. 2011.

ROSSONI, R. D.; SOUZA, R. C.; PEREIRA, C. A.; JORGE A. O. C.; JUNQUEIRA, J.C. Comparação da eficácia fotodinâmica do azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita contra *Candida albicans*. In: VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO , 2008. São José dos Campos. **Anais Eletrônicos**.

SOUZA, Letícia C. **Efeitos Antibacterianos da terapia fotodinâmica usando dois fotossensibilizadores em canais radiculares contaminados com *Enterococcus***

faecalis: estudo in vitro. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2009.

TEGOS, George P. HAMBLIN, Michael R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobi. Agents Chemother.** v. 50, p. 196-203, 2006.

TOREZAN, Luís; NIWA, Ane B. M.; NETO, Cyro F.; Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **An Bras Dermatol.** 2009; 84(5):445-59.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J. A study photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** v. 19, n. 1, p. 75–80, 1997.