



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**REDUÇÃO BACTERIANA COM DIODO EMISSOR DE LUZ
AZUL ASSOCIADO AO FOTOSSENSIBILIZADOR
RODAMINA ÁCIDA B: ESTUDO *IN VITRO* SOBRE
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

MARIA CRISTINA EIKO HASHIMOTO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional na área de Lasers em Odontologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientador:
Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji

**São Paulo
2005**





AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**REDUÇÃO BACTERIANA COM DIODO EMISSOR DE LUZ AZUL
ASSOCIADO AO FOTOSSENSIBILIZADOR RODAMINA ÁCIDA B:
ESTUDO *IN VITRO* SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS***

MARIA CRISTINA EIKO HASHIMOTO

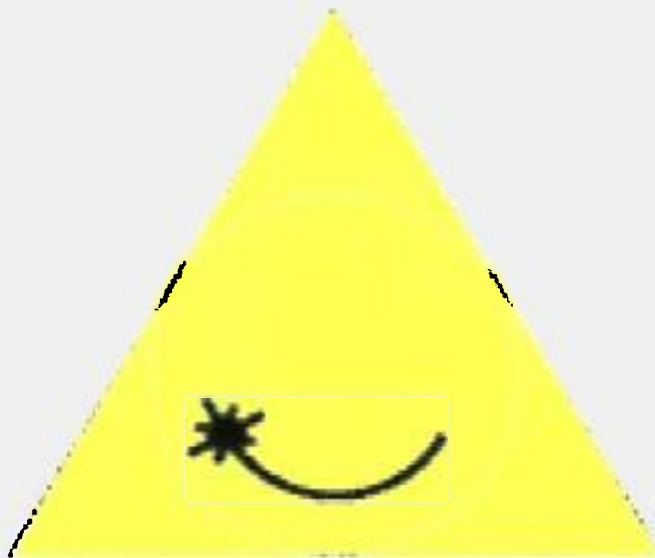


Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional na área de *Lasers em Odontologia*

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientador:
Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji

**São Paulo
2005**



**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE LASERS EM
ODONTOLOGIA**

“Existe uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

Dedicatória

*Ao meu filho Vicente,
motivo do meu orgulho e
fonte da minha coragem
e perseverança.*

*Aos meus pais,
pela presença em todos os momentos,
pelo amor constante, e
principalmente por acreditarem em
mim e na realização dos meus sonhos.*

*Aos meus irmãos,
Júlio e Maria Célia,
pelo carinho, apoio e incentivo.*

É para vocês em especial que dedico este trabalho.

Agradecimentos

*A Deus,
pela Vida,
pelas oportunidades
concedidas e pela
iluminação do meu
caminho.*

Agradeço especialmente,

À minha querida orientadora Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, que com seu carinho, profissionalismo e bom humor contagiante me conduziu até aqui. Meu sincero agradecimento pela sua paciência e dedicação e pela honra de sua orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji pela sua co-orientação, pela sua boa vontade, ajuda e incentivo.

À Prof^a. Dra. Silvana Cai, do Depto. de Microbiologia do ICB-USP, pela sua orientação na área de Microbiologia, pela sua paciência e boa vontade em ensinar e pela seriedade de seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Laércio Gomes, pelo uso do Laboratório de Espectroscopia.

Aos colegas Aécio Yamada Jr., Renato de Araújo Prates e Luiz Cláudio Suzuki, por todos os momentos durante a fase do experimento, pela solidariedade, pelo carinho e incentivo e principalmente pela amizade.

Ao Osvaldo, da MMOptics, Brazil, pelo uso do equipamento Bright Lec II.

À CCI Química Importação Exportação e Representações Ltda., pela amostra cedida da rodamina ácida B.

Ao Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, pela sua orientação no primeiro projeto de pesquisa, pela sua boa vontade em ajudar, pela sua competência, meu sincero reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Makoto Adachi, minha gratidão por ter sido meu professor e amigo, por todos os ensinamentos, por mostrar o caminho e torcer pelas minhas conquistas. Obrigada pelo apoio dado para que eu iniciasse o mestrado, pelo incentivo e pela sinceridade de sua amizade.

Ao Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef, pela oportunidade de estágio no Depto. de Dentística da FOUSP e pelo incentivo para que eu iniciasse o mestrado.

Ao Prof. Dr. Flávio Carnevale Filho, pela sua amizade, pelo seu incentivo, meu sincero agradecimento.

À amiga Patrícia Ebel, pela solidariedade, pela amizade sincera e generosidade. Muito obrigada.

À amiga Ana Paula Franchi, pela solidariedade nos momentos difíceis, pela amizade incondicional e pela sua imensa bondade.

Ao colega Aguinaldo Silva Garcez Segundo, pelo auxílio nas fotos das colônias de *Streptococcus mutans*.

A todos os professores e funcionários do mestrado profissionalizante pela paciência e dedicação, muito obrigada.

A todos os colegas do mestrado profissionalizante e acadêmico, pelos momentos de descontração e alegria e pela amizade.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para que eu concluísse este trabalho, meu sincero agradecimento.

Redução bacteriana com diodo emissor de luz azul associado ao fotossensibilizador rodamina ácida B. Estudo *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*.

Maria Cristina Eiko Hashimoto

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) consiste no uso de um fotossensibilizador (FS), oxigênio e uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante com o agente fotossensibilizador. Estes fotossensibilizadores absorvem a energia luminosa e são levados a um estado excitado, produzindo espécies reativas de oxigênio que resultam em morte celular. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a redução de *Streptococcus mutans*, *in vitro*, utilizando como FS a rodamina ácida B, utilizada em soluções evidenciadoras de cárie, associada a um diodo emissor de luz azul (LED) de $\lambda=470$ nm; comparar o efeito bactericida de duas diferentes doses e investigar por espectroscopia de absorção óptica a interação do FS com o *S. mutans*, antes e após a irradiação. As amostras bacterianas foram divididas em cinco grupos: controle, rodamina, LED, PDT 3 minutos ($D= 17,52$ J/cm²), PDT 5 minutos ($D= 29,2$ J/cm²). A redução bacteriana foi de 96,74% para $\Delta t=3$ min e de 97,26% para $\Delta t=5$ min. Ambas as doses foram efetivas em reduzir *S. mutans*, mas não mostraram diferenças significantes entre si. A espectroscopia de absorção óptica indicou que houve interação entre o *S. mutans* e a rodamina antes e após a irradiação, e que a absorção muda quando a dose é fracionada. Estes resultados sugerem que a terapia fotodinâmica utilizando um diodo emissor de luz azul associado à rodamina ácida B pode ser um método efetivo para redução de *S. mutans*.

Lethal photosensitization following blue light emitting diode and acid rhodamine B. *In vitro* study on *Streptococcus mutans*.

Maria Cristina Eiko Hashimoto

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) requires the usage of a photosensitizer (PS), oxygen and light of an appropriate wavelength. These photosensitizers absorb the light photon and are led from their stable ground state to an unstable excited state, producing cytotoxic reactive oxygen species responsible for cellular death. The purposes of this study were evaluate whether *S. mutans* could be killed by light emitting diode (LED), $\lambda = 470$ nm, associated with acid rhodamine B, known for its usage in caries detector solution; compare the bactericidal effect between two different doses and investigate the interaction between the PS and *S. mutans*, before and after irradiation, by optical absorption spectroscopy. The samples were divided into five groups: control, rhodamine, LED, PDT 3 minutes ($D = 17,52$ J/cm²), PDT 5 minutes ($D = 29,2$ J/cm²). The reduction in the mean viable counts was 96,74% for $\Delta t = 3$ min, and 97,26% for $\Delta t = 5$ min. Both doses were effective for killing *S. mutans*, but there was not any significant difference among themselves. The absorption optical spectrum analysis indicated that there was interaction between *S. mutans* and rhodamine before and after irradiation, and the absorption could be changed when the dose is fractioned. These results suggest that photodynamic therapy using a blue light emitting diode associated with acid rhodamine B can be an effective method for killing *S. mutans*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	06
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1 Cárie dental	07
3.1.1 Prevenção da cárie dental	09
3.2 Terapia fotodinâmica	10
3.2.1 Histórico	10
3.2.2 Fundamentos da PDT	11
3.2.3 Mecanismo da citotoxicidade em PDT	13
3.2.4 Agentes Fotossensibilizadores	14
3.3 Diodo emissor de luz azul (<i>light emitting diode</i> – LED)	16
3.4 Ação bactericida da PDT	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	45
ANEXOS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Colônias de <i>S. mutans</i> em placas de Petri em meio de cultura TSA	24
Figura 2	Fórmula estrutural da rodamina ácida B	24
Figura 3	Espectrofotômetro Cary 17 (Varian – USA) do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Óptica do CLA-IPEN	25
Figura 4	Bright LEC II (MMOptics, São Carlos, SP – Brazil)	26
Figura 5	Centrífuga Jouan, modelo A-14	26
Figura 6	Irradiação do grupo B (LED)	27
Figura 7	Irradiação do grupo D (PDT 3 minutos)	28
Figura 8	Irradiação do grupo E (PDT 5 minutos)	28
Figura 9	Diluições das suspensões de <i>S. mutans</i>	29
Figura 10	Câmara de fluxo laminar do Laboratório de Microbiologia Oral (ICB-USP)	29
Figura 11	Espectro de absorção da rodamina ácida B	31
Figura 12	Rodamina 0,1%: Espectro de absorção da rodamina ácida B a 0,1%; SM+rodamina PIT: Espectro de absorção do <i>S. mutans</i> + rodamina após tempo de pré-irradiação de 5 minutos; PDT 3 minutos: Espectro de absorção do	32

S. mutans + rodamina após PDT por 3 minutos;
PDT 5 minutos: Espectro de absorção do
S. mutans + rodamina após PDT por 5 minutos

Figura 13	Gráfico da absorção do <i>S. mutans</i> em $\lambda = 470$ nm durante a PDT de 1 a 5 minutos	33
Figura 14	Alterações na absorção da rodamina ácida B após associação com <i>S. mutans</i> e após PDT	34
Figura 15	Alterações na absorção do <i>S. mutans</i> após a PDT	35
Figura 16	Número de células viáveis de <i>S. mutans</i> nos grupos	36
Figura 17	Número de células viáveis de <i>S. mutans</i> , em porcentagem, antes e após PDT	37

LISTA DE ABREVIATURAS

He-Ne	Hélio Neônio
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
PDT	Terapia Fotodinâmica
PIT	Tempo de pré-irradiação
FS	fotossensibilizador
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
W	watt
nm	nanometro
LED	diodo emissor de luz
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
mW	miliwatt
BHI	infusão de cérebro coração
GaAs	Arseneto de Gálio
TSA	Tryptone Soja Ágar
s	segundo

TSB	Caldo de Triptone Soja
M	concentração molar
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
TBO	Azul de orto toluidina
mm	milímetro
kHz	kilohertz
mW/cm ²	miliwatt por centímetro quadrado
J	joule
mg/mL	miligrama por mililitro
g/mol	grama por mol
ufc/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
mM	milimolar
°C	grau Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
PBS	<i>sodium phosphate buffer</i>
CO ²	dióxido de carbono

λ	comprimento de onda
Δt	tempo
D	dose
AlPcS ₂	ftalocianina alumínio disulfonatado
Ca ⁺⁺	Cálcio
tT	Tempo de vida
φT	estado tripleto

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros registros da doença cárie datam de cerca de 280 milhões de anos, sendo os primeiros achados em fósseis de peixes. Posteriormente, foram encontrados registros em dinossauros herbívoros há 70 milhões de anos; em fósseis de répteis, macacos e pré-hominídeos, há 54 milhões de anos; e em mamíferos há 25 milhões de anos. No *Homo sapiens*, os achados datam de mais de 1 milhão de anos (LERMAN, 1964).

Durante estes séculos, várias foram as teorias elaboradas para o esclarecimento desta doença e a busca por uma resposta vem desde a época dos Sumérios (NEWBRUM, 1988).

Hipócrates, em 460-370 a.C. deu importância à presença de alimentos na boca, sugerindo que fatores locais e gerais interferiam na presença de cárie. Aristóteles, em 384-322 a.C. descreveu que figos macios e doces se aderiam aos dentes, apodreciam e causavam cáries. Anthony van Leeuwenhoek (1683), o pai da moderna microscopia, descreveu pequenos microorganismos "extraídos de um dente comprometido", afirmando que os mesmos causavam desconforto e dor de dente. Porém, apenas no final do séc. XX Miller deu cunho científico às investigações, afirmando que a cárie era causada por ácidos produzidos pelos microorganismos da boca (LERMAN, 1964).

A associação clínica entre a presença do *Streptococcus mutans* e a doença cárie em humanos foi demonstrada em um número considerável de estudos. Pesquisas longitudinais confirmaram o papel importante do *S. mutans* na maioria das cáries de fissura, interproximal e de superfície lisa e sugeriram que a predominância do *S. mutans* antecedia a predominância dos lactobacilos. A complexidade da relação flora-cárie e as dificuldades de amostragem de um sítio que reflita a realidade do desenvolvimento da cárie dificultam o estabelecimento de afirmações absolutas relacionadas com a seqüência de eventos envolvidos com o início da lesão cariosa (LOESCHE, 1993).

As bactérias encontradas na cavidade oral geralmente podem ser divididas em dois grandes grupos: patógenos principais, fortemente associados às cáries, e as bactérias que são encontradas juntas com os patógenos principais na microbiota das lesões iniciais e dentina cariada. As bactérias mais importantes associadas às lesões de cárie em humanos estão incluídas no grupo dos estreptococos, sendo a mais importante o *S. mutans* (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001).

Os *S. mutans* são os principais patógenos da cavidade oral, têm a capacidade de sintetizar a partir de carboidratos metabolizados, um polímero extracelular denominado dextrano, que por sua vez auxilia esses microorganismos no processo de adesão ao esmalte dentário. Os lactobacilos são colonizadores secundários, responsáveis pelo progresso das lesões cavitadas. Os actinomicetos predominam nas superfícies radiculares dos dentes (LOESCHE, 1993).

Após a desmineralização do esmalte, a lesão progride lentamente em direção à dentina, formando uma área de dentina desmineralizada sob uma zona desmineralizada e infectada com bactérias. Clinicamente, é difícil distinguir essas zonas e a remoção apenas da dentina contaminada é extremamente crítica; conseqüentemente, grande quantidade de tecido sadio é removida durante o preparo cavitário (BURNS *et al.*, 1994). O desenvolvimento de uma nova terapia capaz de matar bactérias cariogênicas *in situ*, reduziria a necessidade de remoção de uma grande quantidade de tecido sadio, aumentando dessa forma, a longevidade do elemento dental restaurado (BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995).

O processo patogênico pode ser prevenido, revertido ou retardado pela remoção ou alteração do ambiente e dos fatores microbiológicos adversos. O controle microbiano ou as abordagens terapêuticas mais desejáveis são aquelas em que não haja impacto a longo prazo na microbiota residente, ou se alguma adaptação ocorrer, não resulte em patogenicidade contínua (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001).

A redução de microorganismos patogênicos da superfície dental é uma das estratégias de prevenção e controle da doença cárie, porém, nem sempre se consegue o controle mecânico do biofilme. Neste sentido, várias terapias podem ser empregadas como a utilização de agentes quimioterápicos e quimioprofiláticos, *lasers* em alta intensidade pela geração de calor, ou a terapia fotodinâmica (PDT – *photodynamic therapy*), objeto deste estudo.

Estudos anteriores mostraram que agentes antimicrobianos tradicionais podem causar problemas de resistência bacteriana (COURVATIN, 1996). Tentativas prévias de esterilização da dentina através do uso de materiais fenólicos apresentaram efeito deletério à polpa devido à difusão de materiais tóxicos ao longo dos túbulos dentinários (FUSAYAMA, 1998). A terapia fotodinâmica surge neste cenário como uma alternativa promissora, pois não existem na literatura indícios de resistência microbiana à PDT e esta, por sua vez, pode ser confinada à área da lesão pela aplicação cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra óptica, quando necessário (WILSON, 1993).

Alguns estudos demonstraram que diversas espécies de bactérias orais, na presença de um apropriado agente fotossensibilizador (FS) podem ser mortas por um *laser* em baixa intensidade (VENEZIO *et al.*, 1985; OKAMOTO *et al.*, 1992; DOBSON e WILSON, 1992; WILSON e MIA, 1993; WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; WALSH, 1997; ROVALDI *et al.*, 2000; KÖMERIK e WILSON, 2002; SEAL *et al.*, 2002; MATEVSKI *et al.*, 2003).

A terapia fotodinâmica na Odontologia pode ser uma alternativa no combate a infecções locais. Nesse caso, não é necessário que a fonte de luz seja proveniente de um *laser* em baixa intensidade e sim, que o fotossensibilizador penetre na bactéria e que a fonte de luz possua comprimento de onda ressonante com o fotossensibilizador para a produção de espécies reativas de oxigênio que irão causar morte celular.

O diodo emissor de luz (LED - *light emitting diode*) é uma fonte de luz alternativa em relação ao *laser* de baixa potência e apresenta como vantagens a possibilidade de produção de equipamentos compactos e de menor custo, além de possuírem uma banda espectral mais ressonante à banda de absorção do fotossensibilizador.

Agentes fotossensibilizadores têm sido estudados desde 1900, e o seu interesse tem crescido durante as décadas passadas devido à possibilidade de uso destes agentes no diagnóstico e tratamento de tumores malignos (SANDERSON *et al.*, 1972; BENSON *et al.*, 1982).

A rodamina ácida B é um composto químico utilizado em soluções evidenciadoras de cárie. A concentração utilizada para este fim é de 1% diluída em propilenoglicol, não apresentando qualquer efeito tóxico, mutagênico ou cancerígeno (FUSAYAMA, 1997).

Sua utilização como evidenciador de cáries é devido à sua capacidade de penetrar na dentina cariada pela quebra irreversível das ligações intermoleculares e, portanto, corando a região de dentina infectada e desorganizada, o que não ocorre com a dentina sadia por esta possuir uma estrutura molecular que não permite a penetração do corante. Dessa forma, a rodamina ácida B é capaz de diferenciar a dentina sadia da dentina infectada e desorganizada (FUSAYAMA, 1998).

A rodamina ácida B é um corante da família das rosaminas, utilizado também na fabricação de produtos cosméticos e tem como fórmula química $C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$ (hidrogênio 3,6 - bis dietilamino 9, 2,4 disulfonatofenil xantiliun), de peso molecular 580.7 g/mol. É conhecida na literatura pelos seguintes sinônimos: *C 177*, *Food Red 106*, *Amido Rhodamine B*, *acid red 52*, *sulforhodamine B*, *Amacid Rhodamine B*, *Solar Rhodamine B*, *Red no. 106*, *Rose Covasol W 4002*, *Erio Acid Red XB*, *Acid leather Red KB*, *Aizen Food Red no. 106*, *Acid Red XB*, *Pontancyl Brilliant Pink*. Até o presente momento não foram encontrados registros de sua utilização como fotossensibilizador dentro do princípio da terapia fotodinâmica.

Se as bactérias que causam a cárie pudessem ser eliminadas *in situ*, a necessidade de remoção de uma grande quantidade de dentina poderia ser minimizada, aumentando dessa forma a longevidade do elemento dental. A utilização da rodamina ácida B como fotossensibilizador viabilizaria uma nova alternativa para a redução bacteriana através da terapia fotodinâmica, seja no aspecto preventivo, para matar bactérias patogênicas presentes em biofilmes dentais ou, devido à sua capacidade de corar dentina infectada e desorganizada, para a eliminação de bactérias *in situ*, através da aplicação localizada do corante e irradiação por uma fonte de luz adequada. Dessa forma, seria possível atuar de maneira mais conservadora em relação ao elemento dental, diminuindo a necessidade de remoção de uma grande quantidade de tecido sadio.

2. OBJETIVOS

- Investigar se a rodamina ácida B, conhecida pela sua utilização em soluções evidenciadoras de cárie, pode ser utilizada como agente fotossensibilizador, para redução de *S. mutans*, utilizando um diodo emissor de luz azul;
- Comparar o efeito bactericida sobre *S. mutans* utilizando duas diferentes doses;
- Investigar, por espectroscopia de absorção óptica, a interação da rodamina ácida B com o *S. mutans* antes e após a terapia fotodinâmica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cárie dental

Em 1890, Miller sugeriu que a cárie dental seria o resultado da ação de ácidos orgânicos sobre os fosfatos de cálcio do dente. Ele concluiu que o ácido formado pelas bactérias da saliva resultava na decomposição do dente. Com isto formulou a teoria "quimioparasitária" da cárie dental. O trabalho de Miller formou a base para a teoria atual "placa-hospedeiro-substrato" de formação da cárie.

Imediatamente após a limpeza da superfície dental, ocorre a deposição de uma camada acelular denominada película adquirida. Os microorganismos pioneiros na colonização desta película são os estreptococos (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) e em proporções menores Neisseria e Actinomyces (GIBBONS E HAY, 1988).

A cárie dental é uma doença crônica infecto-contagiosa, de caráter multifatorial, ou seja, dependente de fatores genéticos, ambientais, dietéticos e bacterianos. É uma doença complexa que envolve uma desmineralização inicial do esmalte seguido da destruição da fase orgânica da dentina (LOESCHE, 1993).

A cárie progride lentamente através do esmalte, e se desloca rapidamente dentro da dentina. Esta alteração no ritmo de desenvolvimento pode ser explicada pela composição química do esmalte e dentina. O esmalte tem 99% de mineral e 1% de proteína, enquanto a dentina contém 70% de mineral e 30% de matriz orgânica. A lesão em esmalte progride lentamente, pois o ácido derivado do metabolismo da placa pode ser neutralizado por tampões salivares, de maneira que a desmineralização do esmalte progride lentamente. Quando a lesão se estende em direção à dentina, a influência do tampão salivar diminui e a lesão dentinária torna-se um sítio retentivo onde predominam os pHs baixos. O pH baixo, por sua vez, altera o microambiente. Além de solubilizar os minerais da dentina, os pHs baixos desnaturam o colágeno da mesma e selecionam, com grande capacidade, os microorganismos capazes de sobreviver e crescer em condições ácidas e metabolizar o colágeno desnaturado. Estes fatores fazem com

que as lesões de dentina sejam bastante distintas das lesões de esmalte, e oferecem uma explicação para a rápida destruição do tecido dentinário (LOESCHE, 1993).

Poucas bactérias da cavidade oral possuem collagenases. Todavia, o colágeno é prontamente desnaturado pelo ácido, formando gelatina, que é degradada por muitos microorganismos orais. Assim, a seguinte seqüência é possível na lesão dentinária: o ácido solubiliza a porção mineral do dente, expondo a matriz de colágeno. O ácido, bem como componentes de sais com alta concentração de Ca^{++} , desnaturam o colágeno. As proteases bacterianas degradam o colágeno-gelatina em peptídeos e aminoácidos de baixo peso molecular, que podem ser utilizados na biossíntese bacteriana. O processo é auto-repetitivo, determinando a extensão da lesão com os produtos do desdobramento de colágeno transformados em proteína microbiana (LOESCHE, 1993).

A lesão incipiente ocorre quando a atividade acidogênica do cariogênico causa o deslocamento dos minerais do dente para a superfície do esmalte, com a finalidade de tamponar o pH na interface placa-esmalte. A amostra para exame bacteriológico nesta fase deve revelar tanto um aumento proporcional como absoluto nas concentrações do microorganismo cariogênico, como o caso do *S. mutans* (LOESCHE, 1993).

Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), a doença cárie e as periodontopatias estão entre as doenças mais prevalentes do ser humano, atingindo homens e mulheres de todas as idades, grupos étnicos e classes sociais. O Brasil faz parte do grupo de países com as 10 maiores prevalências de cárie do mundo (MEDEIROS, 1998).

A microbiota oral dos humanos compreende cerca de 400 espécies bacterianas, além de fungos, protozoários e vírus, porém, o desenvolvimento das doenças nesse ambiente só vai ocorrer quando houver um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano. Certas condições ambientais, como por exemplo, um aumento na freqüência de consumo da sacarose pode levar ao

desenvolvimento de espécies sacarolíticas acidúricas e acidogênicas como os estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos, causando a destruição dos tecidos mineralizados dos dentes (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

3.1.1. Prevenção da cárie dental

É conhecido na literatura que uma das principais estratégias de prevenção e controle da doença cárie é a redução de microorganismos patogênicos da superfície dental. Neste sentido, várias terapias podem ser empregadas como a utilização de agentes quimioterápicos e quimioprolifáticos (LASTER e LOBENE, 1990; JENKINS *et al.*, 1991; SCHEAEKEN *et al.*, 1991; MELBERG *et al.*, 1991), lasers em alta intensidade pela geração de calor (MORITZ *et al.*, 1997; MAIORANA *et al.*, 2002; GUTKNECHT *et al.*, 2002; CORTES, 2003), ou a terapia fotodinâmica (VENEZIO *et al.*, 1985; OKAMOTO *et al.*, 1992; DOBSON e WILSON, 1992; WILSON e MIA, 1993; WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; WALSH, 1997; ROVALDI *et al.*, 2000; KÖMERIK e WILSON, 2002; SEAL *et al.*, 2002; MATEVSKI *et al.*, 2003).

A seleção de uma substância antimicrobiana deve levar em conta alguns fatores, considerando a particularidade do ambiente bucal. Em primeiro lugar, deve ser avaliada a toxicidade da substância em relação aos tecidos da cavidade bucal, pois a maioria dos antimicrobianos utilizados, por serem inespecíficos, pode provocar efeito colateral. Em segundo lugar, a substância deve ser de baixa permeabilidade pelos tecidos bucais, considerando efeitos gerais para a saúde. Em terceiro lugar, a substância antimicrobiana não deve provocar desequilíbrio da microbiota residente na cavidade bucal, pois levaria a outras doenças decorrentes da proliferação de microorganismos oportunistas. Por último, para que uma substância antimicrobiana seja eficiente na cavidade bucal, ela precisa apresentar substantividade (retentividade), pois, devido ao fluxo contínuo de saliva, o efeito quimioterápico seria diluído rapidamente (SCHEIE, 1989; GOODSON, 1989).

A maioria dos agentes quimioprolifáticos consiste de antimicrobianos de amplo espectro que são utilizados de acordo com a hipótese da placa não

específica. Os componentes da microbiota oral apresentam vários graus de susceptibilidade a tais agentes e, portanto, seu uso pode causar desequilíbrio ecológico desfavorável. Pode-se esperar que qualquer agente químico que afete as células microbianas tenha alguns efeitos prejudiciais contra as células do hospedeiro, a menos que a estrutura alvo ou via metabólica seja exclusiva da célula microbiana (GIERTSEN *et al.*, 1989). Existem relatos na literatura de que agentes antimicrobianos tradicionais podem causar problemas de resistência bacteriana (COURVATIN, 1996).

A terapia fotodinâmica, inicialmente utilizada para o tratamento de tumores, pode ser uma alternativa para a redução de microorganismos cariogênicos, tanto aqueles presentes em biofilmes, atuando de forma preventiva, ou através da eliminação de bactérias *in situ*, minimizando dessa forma a quantidade de tecido sadio a ser removido durante o preparo cavitário convencional. Alguns trabalhos demonstraram o potencial bactericida desta modalidade de terapia, utilizando *lasers* em baixa intensidade (VENEZIO *et al.*, 1985; OKAMOTO *et al.*, 1992; DOBSON e WILSON, 1992; WILSON e MIA, 1993; WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; WALSH, 1997; ROVALDI *et al.*, 2000; KÖMERIK e WILSON, 2002; ZANIN *et al.*, 2002; SEAL *et al.*, 2002; MATEVSKI *et al.*, 2003).

3.2 Terapia fotodinâmica (PDT)

3.2.1. Histórico

No início do século passado, acreditava-se que a luz dava bons resultados na cura do câncer. Oscar Raab, em 1900, descobriu que se colocasse um recipiente ao sol contendo um organismo unicelular injetado com corante, a célula morria em seis minutos; o mesmo não ocorria quando este era colocado em um recipiente escuro. Em um trabalho inicial de Raab, utilizando corantes em placas de Petri contendo protozoários, observou-se que, quando os experimentos eram realizados durante o dia, ocorria a morte destes organismos, o que não ocorria quando eram realizados durante a noite. A partir daí, o autor provou a conexão entre a ativação desses corantes pela luz com resultados terapêuticos.

Em 1903, Niels Finsen ganhou o Prêmio Nobel pelo seu trabalho em fototerapia. Finsen descobriu que o tratamento com luz poderia controlar as manifestações na pele da tuberculose, uma doença muito comum na época. (FINSEN, 1901).

De maneira similar, a luz pode tratar outras condições médicas importantes tais como o raquitismo e hiperbillirubinemia neonatal (RON *et al.*, 2004).

Clinicamente, a terapia fotodinâmica começou a ser utilizada apenas por volta dos anos 70 e meados dos anos 80, quando começaram as investigações dentro dos mecanismos e uso clínico dos derivados da hematoporfirina (HpD), para tratamento de tumores. Um *laser* em baixa intensidade é capaz de ativar corantes específicos, produzindo espécies reativas de oxigênio que causam injúria e morte de células tumorais (DOUGHERTY, 1993).

Dentro da Odontologia, a terapia fotodinâmica é assunto de interesse no que diz respeito à ação bactericida contra microorganismos causadores da cárie, doença periodontal e lesões de periápice.

A terapia fotodinâmica é baseada na capacidade de certas substâncias penetrarem preferencialmente dentro de células neoplásicas e a citotoxicidade é então induzida pela ativação destas substâncias com luz de um determinado comprimento de onda (KESSEL, 2004).

3.2.2 Fundamentos da PDT

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento que requer o uso de um fotossensibilizador, oxigênio e uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante com o agente fotossensibilizador. Estes fotossensibilizadores absorvem a energia luminosa e são levados a um estado excitado, produzindo espécies altamente reativas de oxigênio que resultam em injúria e morte celular (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

O efeito fotodinâmico no qual se baseia a PDT ocorre quando a molécula do fotossensibilizador absorve um fóton, que por sua vez sai de seu estado fundamental (S_0) e vai para o estado excitado singleto (S_1). Neste momento pode ocorrer a perda de energia por processos de fluorescência ou conversão interna do estado S_1 para S_0 e/ou ocorrer o processo de cruzamento entre sistemas, levando a molécula para o estado excitado tripleto. A razão das velocidades destes processos determina o rendimento quântico do estado tripleto ϕ_T .

$$\phi_T = k_{ics1} / (k_{fl} + k_{ic} + k_{ics1})$$

Onde k_{ics1} , k_{fl} e k_{ic} são constantes de velocidade dos processos de cruzamento entre sistemas do estado S_1 para estado T_1 , fluorescência e conversão interna, respectivamente.

A energia do estado T_1 pode ser dissipada pelo processo de cruzamento entre sistemas devolvendo a molécula para o estado S_0 ou transferida para outras moléculas no meio. Estes processos determinam o tempo de vida (t_T) deste estado.

$$t_T = 1 / (k_{ics2} + \sum k_{qi} [Q]_i)$$

Onde k_{ics2} é a constante de velocidade do processo de cruzamento entre sistemas do estado T_1 para o estado S_0 , k_{qi} é a constante de supressão do estado tripleto para vários supressores e $[Q]_i$ são as concentrações destes supressores.

Quando uma molécula do fotossensibilizador no seu estado excitado tripleto encontra com uma molécula de oxigênio, que tem seu estado fundamental também tripleto, ela transfere sua energia para esta molécula, formando o estado excitado singleto do oxigênio. O oxigênio neste estado é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, tendo como resultado a morte da célula. Este caminho chama-se “reações tipo II” (AKHMANOV e

CHERNIAEVA, 1990; OSCHNER, 1997; HULTÉN *et al.*, 1999; MOOR, 2000; KANOFSKY e SIMA; 2000).

A molécula de oxigênio no estado singleto também pode perder energia por processos de emissão de fóton ou de cruzamento entre sistemas e voltar para o seu estado fundamental sem começar as reações. Esses processos determinam o tempo de vida do estado singleto $t (^1\Delta_g)$:

$$t (^1\Delta_g) = 1 / (k_{em} + k_{ics3} + \sum k_{ri} [R]_i)$$

onde k_{ics3} é a constante de cruzamento entre sistemas para o estado singleto; k_{em} e k_{ri} são as constantes de velocidade dos processos de emissão de fótons e de reação química entre o oxigênio singleto e o reagente e $[R]_i$ que são as concentrações destes reagentes.

Então, a eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico e o tempo de vida do estado tripleto do fotossensibilizador aumentam.

Existe um outro caminho chamado "reações tipo I" que inclui as reações de transferência de elétron entre a molécula do sensibilizador no seu estado excitado (S_1) e as moléculas do ambiente. Porém, devido ao curto tempo de vida do estado S_1 , a participação deste processo não ultrapassa 10% do efeito total do processo (DOUGHERTY *et al.*, 1998; HULTÉN *et al.*, 1999; MOOR, 2000; KANOFSKY e SIMA; 2000).

3.2.3. Mecanismo da citotoxicidade em PDT

O degrau inicial para a terapia fotodinâmica é a absorção da luz por um fotossensibilizador, promovendo a migração da molécula deste fotossensibilizador de seu estado estável para um estado excitado com um tempo de vida extremamente curto (estado singleto excitado). O estado singleto pode tanto decair para seu estado fundamental, emitindo luz na forma de fluorescência, ou ser transformado em um estado excitado tripleto. O fotossensibilizador em seu

estado tripleto excitado interage rapidamente com moléculas vizinhas e oxigênio, gerando a formação de peróxidos, íons superóxidos, radicais hidroxila e oxigênio singleto. Acredita-se que o oxigênio singleto seja o principal responsável pela citotoxicidade devido à sua eficiente interação com diferentes biomoléculas. Os efeitos da terapia fotodinâmica são detectáveis dentro de poucas horas após a PDT e incluem mudanças bioquímicas e microscópicas nas membranas e organelas celulares, tais como a inativação de enzimas, aumento da permeabilidade celular, interrupção do processo de divisão celular, interrupção da respiração celular e lise da célula (KONAN *et al.*, 2002).

Estruturas da célula como, por exemplo, a mitocôndria, o retículo endoplasmático, lisossomos, complexo de Golgi, membrana plasmática podem ser alvos da terapia fotodinâmica. Danos a essas estruturas podem levar à morte celular. Em cultura de células e em modelos animais, esta morte envolve um mecanismo conhecido como apoptose (KESSEL, 2004).

Em um estudo envolvendo a dinâmica de oxigenação das células foram utilizados regimes de dose contínua e doses fracionadas sobre queratinócitos normais de pele humana. No regime de doses fracionadas foram realizadas quatro exposições de 10 s cada, com um intervalo de 200 s, mantendo-se a potência do *laser* constante. Os resultados deste estudo mostraram que o regime de doses fracionadas causa um aumento na taxa de oxigenação durante o momento inicial da segunda, terceira e quarta fração de irradiação. Os autores sugerem que o intervalo entre as irradiações causa uma re-oxigenação das células, permitindo um aumento da geração de oxigênio entre as frações de irradiação. Como o oxigênio exerce um papel fundamental na degradação de espécies fluorescentes, os autores argumentam que o fracionamento da dose pode melhorar a eficácia da terapia fotodinâmica (MPHIL, *et al.*, 2004).

3.2.4 Agentes fotossensibilizadores

Agentes fotossensibilizadores têm sido estudados desde 1900. Durante as décadas passadas, devido à possibilidade de uso destes agentes no diagnóstico e tratamento de tumores malignos várias pesquisas foram conduzidas com o

objetivo de encontrar um composto ideal (SANDERSON *et al.*, 1972; BENSON *et al.*, 1982; ALLISON *et al.*, 2004).

Fotossensibilizadores dentro da terapia fotodinâmica são as ferramentas que permitem a transferência da energia luminosa em um tipo de reação química, cujos produtos finais resultam numa rápida cito e vásculo-citotoxicidade que são condições *sine qua non* para a terapia fotodinâmica (KONAN, 2002).

Para que um composto seja considerado um bom fotossensibilizador deve apresentar algumas das seguintes propriedades: alto coeficiente de absorção na região do espectro de excitação da luz, estado tripleto de apropriada energia, para permitir a transferência de energia ao estado singleto, alta eficiência quântica para a formação de oxigênio singleto, alto tempo de vida do estado tripleto e alta fotoestabilidade (DE ROSA e CRUTCHLEY, 2002).

A eficiência quântica de um composto está diretamente relacionada à sua capacidade de gerar oxigênio singleto. Como se acredita que o oxigênio singleto seja o principal responsável pela citotoxicidade devido à sua eficiente interação com diferentes biomoléculas, pode-se dizer que a alta eficiência quântica de um agente fotossensibilizador é uma característica desejada para sua utilização em PDT (KONAN *et al.*, 2002).

Além das características acima, o fotossensibilizador deve apresentar baixa toxicidade, rápida eliminação pelo organismo, seletividade pelo tecido alvo, capacidade de ativação por um determinado comprimento de onda, fácil aplicação e não deve apresentar potencial mutagênico ou carcinogênico (RON *et al.*, 2004).

A terapia fotodinâmica tem um potencial para se tornar uma grande ferramenta de uso clínico, porém, maiores estudos ainda devem ser conduzidos no sentido de encontrar agentes fotossensibilizadores ideais, assim como determinar uma correta dosimetria. Para superar tais dificuldades, é necessário o conhecimento dos mecanismos fundamentais da terapia fotodinâmica e das propriedades ópticas dos vários tecidos humanos com ou sem fotossensibilizadores (ALLISON *et al.*, 2004).

A rodamina ácida B, utilizada neste estudo, é um composto químico utilizado, entre outros fins, em soluções evidenciadoras de cárie. A concentração utilizada para este fim é de 1% diluída em propilenoglicol, não apresentando qualquer efeito tóxico, mutagênico ou cancerígeno. Sua utilização como evidenciador de cáries é devido à sua capacidade de penetrar na dentina cariada pela quebra irreversível das ligações intermoleculares e, portanto, corando a região de dentina infectada e desorganizada, o que não ocorre com a dentina sadia devido esta possuir uma estrutura molecular que não permite a penetração do corante. Dessa forma, a rodamina ácida B é capaz de diferenciar a dentina sadia da dentina infectada e desorganizada (FUSAYAMA, 1997; FUSAYAMA, 1998).

A rodamina ácida B é um corante da família das rosaminas, também utilizado na fabricação de produtos cosméticos e tem como fórmula química $C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$ (hidrogênio 3,6 – bis dietilamino 9, 2,4 disulfonatofenil xantilium), de peso molecular 580.7g/mol. É conhecida na literatura pelos seguintes sinônimos: *C 177, Food Red 106, Amido Rhodamine B, acid red 52, sulforhodamine B, Amacid Rhodamine B, Solar Rhodamine B, Red no. 106, Rose Covasol W 4002, Erio Acid Red XB, Acid leather Red KB, Aizen Food Red no. 106, Acid Red XB, Pontancyl Brilliant Pink*.

3.3 Diodo emissor de luz (*light emitting diode* – LED)

Um LED possui uma luz com potência máxima quando direcionada perpendicularmente à superfície irradiada (FLOYD, 1991).

O diodo emissor de luz consiste num dispositivo com meio ativo semicondutor composto de várias camadas de semicondutores dopados adequadamente e que emitem luz quando uma determinada tensão é aplicada entre as camadas. Nos diodos emissores de luz, a luz é produzida por um processo chamado eletroluminescência (CRAFORD *et al.*, 2001).

Sua composição é semelhante aos *lasers* de diodo semicondutores que são utilizados em diversas áreas como terapia com *laser* em baixa intensidade,

aparelhos de CD e DVD, leitores de códigos de barra, entre outros. O LED azul é um semicondutor confeccionado à base de nitreto de gálio, gerando menos calor e podendo ser até dezessete vezes mais eficiente do que as lâmpadas convencionais. Comparando os *lasers* e os LEDs, os *lasers* são monocromáticos, apresentando alta pureza espectral, enquanto o LED possui uma banda estreita de comprimentos de onda, ou seja, a luz do LED azul é azul, azul-esverdeada e azul-violeta (TUBOY, 2003).

O feixe de luz do *laser* é coerente e o do LED é não-coerente. No entanto, isso não significa que a intensidade produzida por um feixe de luz *laser* seja maior que a do LED. Porém, a interação da luz com a célula bacteriana depende de outros fatores como comprimento de onda, potência da luz e tempo de exposição. Tais fatores dirão se os efeitos serão fotoquímicos, fototérmicos, fotoablativos ou fotomecânicos (MANG, 2004).

O uso do LED para terapia fotodinâmica tem sido discutido em estudos recentes, já que não é necessária uma luz coerente para a PDT, pois esta coerência é perdida em alguns décimos de milímetros após a penetração no tecido (BRANCALEON e MOSELEY, 2002; JUZENIENE *et al.*, 2004).

Ao contrário de uma fonte de luz com alta intensidade monocromática, o LED é capaz de produzir uma alta intensidade sobre uma banda espectral mais abrangente. Para a PDT, a característica de monocromaticidade é importante; entretanto, a efetividade da fonte de luz vai depender de fatores como a irradiância espectral, transmissão no tecido e propriedades de absorção do fotossensibilizador (BRANCALEON e MOSELEY, 2002).

Fatores bacterianos também irão interferir, logicamente, tais como a natureza da bactéria, seu estado fisiológico, densidade da população e ambiente em que está envolvida. Parâmetros importantes são a cor, condutividade térmica e pH, assim como seus componentes orgânicos (WILSON, 1993).

Muitas aplicações médicas, incluindo a terapia fotodinâmica, envolvem o uso de *lasers*. Todavia, como a coerência da luz não é necessária para a PDT,

pesquisas têm sido feitas para a construção de fontes de luz não coerentes para esta finalidade, já que são relativamente estáveis, acessíveis, fáceis de operar e requerem manutenção simples. JUZENIENE *et al.*, 2004, realizaram um estudo utilizando fotopolimerizador convencional, com luz halógena e filtro, de comprimento de onda de 560-740 nm e um LED de comprimento de onda de 600-650 nm. Os resultados mostraram a eficiência da terapia fotodinâmica na inativação de células *in vitro* e que o LED apresentou uma maior penetração no tecido do que o fotopolimerizador com luz halógena.

Lasers e fontes de luz não coerentes têm sido utilizados em terapia de tumores apresentando efeitos similares, o que torna viável a utilização de LEDs para a terapia fotodinâmica (WITHEHURST *et al.*, 1995; MOSELEY, 1996; SOLER *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 2003; JUZENIENE *et al.*, 2004).

Os LEDs são aparelhos compactos, e requerem menos energia para a produção da luz de comprimento de onda desejado, podendo ser utilizados na ativação de fotossensibilizadores administrados topicamente, onde uma grande penetração de luz no tecido não é necessária (MANG, 2004).

3.4. Ação bactericida da PDT

Derivados de hematoporfirina, utilizados para terapia fotodinâmica de tumores foram utilizados com a finalidade de se obter efeito bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus M-G intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus magnus* e *Clostridium perfringes*. A luz utilizada para ativação da hematoporfirina foi a luz de um projetor de 300W, que produz 100 mW de luz no comprimento de onda de 630 a 640 nm, durante 20 minutos. Os resultados foram positivos para todas as bactérias citadas (VENEZIO *et al.*, 1985).

Nos últimos anos, a terapia fotodinâmica tem sido utilizada com a finalidade de se obter efeito bactericida sobre microorganismos bucais. A ação bactericida pode ser obtida através de corantes que variam do azul, púrpura e verde que são fortemente absorvidos em $\lambda=632$ nm. Este trabalho utilizou o azul de orto toluidina

(TBO) a 75 µg/mL e um *laser* de HeNe de $\lambda=632,8$ nm. Os resultados mostraram que a luz vermelha visível pode exercer uma ação inibitória de crescimento de microorganismos do biofilme dental quando um corante apropriado é utilizado (OKAMOTO *et al.*, 1992).

A terapia fotodinâmica tem mostrado sua efetividade na redução bacteriana de microorganismos patógenos bucais, mesmo quando essas bactérias se encontram em biofilmes, como ocorre na placa subgingival. Este estudo utilizou os fotossensibilizadores cristal violeta, TBO, azul de metileno, ftalocianina, hematoporfirina e hematoporfirina éster, em concentrações variando de 0,1% a 0,005%. O *laser* utilizado foi o HeNe de $\lambda=632,8$ nm, com potência de 7,3 mW. As espécies bacterianas testadas foram o *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, todas em forma de biofilmes. As bactérias foram submetidas à irradiação por 10 s, 30 s e 60 s. O cristal violeta, azul de metileno, TBO e ftalocianina foram capazes de sensibilizar *S. sanguis* em forma de biofilmes com tempo de exposição de 10 s ($D=5,5\text{J}/\text{cm}^2$). TBO e azul de metileno na concentração de 0,005% se mostraram efetivos contra biofilmes das quatro espécies bacterianas testadas nos tempos de 10 s e 30 s. Em contraste, fotossensibilizadores como hematoporfirina, hematoporfirina éster e ftalocianina que são utilizados na terapia fotodinâmica de tumores não apresentaram resultados efetivos com a concentração e tempos de exposição empregados (DOBSON e WILSON, 1992).

Suspensões de *Candida albicans* foram sensibilizadas por um *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm), a uma densidade de energia de $66,36\text{ J}/\text{cm}^2$, associado ao TBO, tionina e cristal violeta. Houve a diminuição de unidades formadoras de colônias com o uso dos três fotossensibilizadores. A dihematoporfirina éster, também utilizada neste estudo, não foi eficiente dentro das condições testadas. O *laser* de GaAs ($\lambda=660$ nm) a uma densidade de energia de $2,04\text{ J}/\text{cm}^2$, associado ao azul de metileno foi capaz de sensibilizar *C. albicans*. O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos e o tempo de irradiação foi de 120 s. A maior redução obtida foi com o cristal violeta a 0,5 mg/mL associado ao *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm), apresentando 91% de redução bacteriana (WILSON e MIA, 1993).

Bactérias cariogênicas foram expostas à luz de um *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm) com 7,3 mW e densidade de energia de $33,6 \text{ J/cm}^2$. As bactérias testadas foram o *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*. O corante TBO foi adicionado ao meio de cultura na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. As suspensões bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo Triptone Soja Agar (TSA) e a irradiação realizada em duplicata em diferentes áreas da placa. Os resultados foram efetivos para as quatro espécies testadas. No grupo onde foi adicionado apenas o corante, ou naquele submetido apenas à irradiação não houve redução do número de células viáveis. Os autores sugeriram esta técnica para esterilização de uma lesão de cárie previamente à restauração (BURNS *et al.*, 1993).

S. mutans, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus*, mesmo em forma de biofilmes podem ser sensibilizados utilizando um *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm) com potência de 7,3 mW, ou um *laser* de GaAs ($\lambda=660\text{nm}$), com potência de 11 mW, com tempos de exposição de 60 s, utilizando respectivamente como fotossensibilizadores o TBO ou ADP (ftalocianina alumínio disulfonatado) (BURNS *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1993).

Em outro trabalho, as mesmas espécies de bactérias foram expostas à luz de um *laser* de Arseneto de Gálio e Alumínio ($\lambda=660\text{nm}$) com potência de 11 mW, e diâmetro do feixe de 9 mm, na presença de ADP, com concentrações variando entre $10 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$, e tempos de exposição entre 30 e 90 segundos. O corante foi adicionado ao meio de cultura contendo Caldo de Triptone Soja (TSB), e as suspensões semeadas em placas de Petri contendo Triptone Soja Ágar (TSA). As irradiações foram realizadas em diferentes áreas da placa em duplicata, e incubadas por 48 h para a observação das zonas de crescimento. Os resultados mostraram 93% de redução bacteriana para o *S. mutans* quando a concentração do corante foi de $50 \mu\text{g/mL}$ e tempo de irradiação de 90 s. Para o grupo que utilizou apenas corante, assim como para o grupo que utilizou apenas *laser* não foi observado redução no número de células viáveis (BURNS *et al.*, 1994).

Suspensões de *S. mutans* foram coradas com TBO e ftalocianina e expostos à luz de um *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm) e GaAIAs ($\lambda=660$ nm), respectivamente. Fatias de dentina foram desmineralizadas com solução de EDTA a 0,1 M por 8, 16, 24 e 32 h e interpostas entre o *laser* de HeNe e a suspensão bacteriana para serem submetidas à irradiação, e em experimentos separados, as bactérias foram embebidas em matriz de colágeno antes de serem irradiadas para reproduzir condições mais próximas das encontradas *in vivo*. A potência do HeNe foi de 7,3 W com um feixe de 1,3 mm de diâmetro. A potência do *laser* de GaAIAs foi de 11 mW, com diâmetro do feixe de 9 mm, no modo pulsado com uma taxa de repetição de 20 kHz. Na presença de dentina desmineralizada por 8, 16, 24 e 32 h, a redução bacteriana encontrada foi de 89%, 68%, 82% e 85%, respectivamente, com tempo de irradiação de 480 s. O fotossensibilizador TBO isoladamente causou uma redução significativa no número de bactérias viáveis, correspondendo a 11, 32, 18 e 15%, respectivamente, de morte bacteriana. Quando foi utilizado o *laser* de GaAIAs com a ftalocianina, a redução bacteriana foi de 99,99% para fatias de dentina desmineralizadas por 8, 16, 24 e 32 h. Neste caso, nem o *laser*, nem o fotossensibilizador isoladamente causou qualquer efeito na viabilidade da bactéria. Quando a bactéria foi embebida em colágeno, a redução de 99% foi obtida com irradiação por 180 s. Nem a ftalocianina nem o *laser* isoladamente causou qualquer efeito significativo sobre a viabilidade dos *S. mutans*. Os resultados confirmaram o efeito bactericida mesmo quando as bactérias estão embebidas em uma matriz de colágeno e sob dentina desmineralizada (BURNS *et al.*, 1995).

Amostras de placa bacteriana supragengival foram coletadas e semeadas em meio de cultura para serem submetidas à terapia fotodinâmica. Todas as placas apresentaram crescimento de *Streptococcus sp.* e *Actinomyces sp.* Foram utilizados o *laser* de He Ne ($\lambda=632,8$ nm), com potência de 7,3 mW e diâmetro do feixe de 1,3 mm associado ao TBO, e o *laser* de GaAs ($\lambda=660$ nm), com potência de 11 mW e diâmetro do feixe de 9 mm, no modo pulsado com taxa de repetição de 20 kHz, associado ao fotossensibilizador ftalocianina alumínio disulfonatado (AlPcS₂). Quando as bactérias foram expostas durante 180 s às irradiações dos

lasers de HeNe e GaAs, associadas ao TBO ou AlPcS₂, respectivamente, houve considerável redução no número de células viáveis em todos os microorganismos testados, apresentando 97% de redução sobre espécies anaeróbias utilizando o *laser* de GaAs e 100% de redução sobre *Streptococcus sp.* com o *laser* de HeNe. Apenas o fotossensibilizador ou irradiação isoladamente não mostraram qualquer efeito significativo sobre a redução de células viáveis (WILSON *et al.*, 1995).

A porfirina endógena de algumas bactérias foi capaz de sensibilizar microorganismos patogênicos gram-positivos como o *Propionibacterium acnes*, o *Actinomyces odontolyticus* e *Porphyromonas gingivalis*. A espectroscopia de fluorescência mostrou que estas bactérias sintetizam o fotossensibilizador natural photoporfirina IX. A fonte de luz utilizada foi um *laser* de HeNe, com comprimento de onda de 632,8 nm, intensidade de 100 mW/cm², densidade de energia de 360 J/cm². O número de células viáveis após tratamento foi de 0,58 ufc/mL para *Propionibacterium acnes*, 0,30 ufc/mL para *Actinomyces odontolyticus* e 0,59 ufc/mL para *Porphyromonas gingivalis*. O *S. mutans* não apresentou nenhum fotoefeito, pois não possui a porfirina autofluorescente (KÖNIG, 2000).

Outro estudo sobre o efeito do *laser* mais corante sobre bactérias cariogênicas foi realizado com colônias de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*. O *laser* utilizado para este estudo foi um *laser* de arseneto de gálio alumínio ($\lambda=660$ nm), com potência de saída de 16 mW, sonda de 0,8 mm de diâmetro e densidade de energia de 28,8 J/cm². O fotossensibilizador utilizado foi o TBO com concentração de 100 µg/mL e tempo de exposição de 900 segundos. Observou-se total inibição de crescimento bacteriano no tratamento com *laser* mais corante dentro dos parâmetros acima (ZANIN *et al.*, 2002).

Biofilmes de *Streptococcus intermedius* foram sensibilizados com a associação de 100 µg/mL de TBO e 600 s de irradiação com *laser* de HeNe ($\lambda=632,8$ nm), energia de 21 J e potência de 35 mW. A redução bacteriana foi de 5 log₁₀ UFC (SEAL *et al.*, 2002).

Os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica sobre as células não estão ainda completamente elucidados, porém, existem alguns estudos que sugerem mudanças bioquímicas em membrana celular, causando a lise da célula; em mitocôndria, impedindo o processo de respiração celular; em DNA, impedindo o processo de divisão celular; pela inativação de enzimas responsáveis pelo metabolismo celular e pelo aumento da permeabilidade celular (GREBENOVÁ *et al.*, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A bactéria utilizada nesse estudo foi *S. mutans* (ATCC 25175) (Figura 1) mantido em estoque no laboratório de Microbiologia Oral, ICB/USP. Este trabalho foi realizado com a colaboração da Profa. Silvana Cai (ICB/USP).



Figura 1: Colônias de *S. mutans* em placas de Petri em meio de cultura TSA.

O fotossensibilizador utilizado foi a rodamina ácida B, que pertence à família das rosaminas, e tem como fórmula química $C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$ (hidrogênio 3,6 – bis dietilamino 9, 2,4 disulfonatofenil xantilium), de peso molecular 580.7 g/mol.

A amostra da rodamina ácida B (Q-X-434/45100) foi gentilmente cedido pela CCI Química Importação e Exportação e Representações Ltda. A fórmula química estrutural está ilustrada na figura 2.

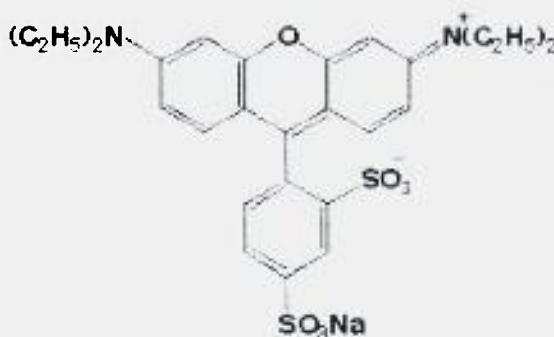


Figura 2: Fórmula estrutural da rodamina ácida B.

As espectroscopias de absorção óptica foram realizadas com o espectrofotômetro Cary 17 (Varian, USA), utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1mm (Figura 3). Todas as leituras foram realizadas mantendo-se a temperatura ambiente de 25° C.

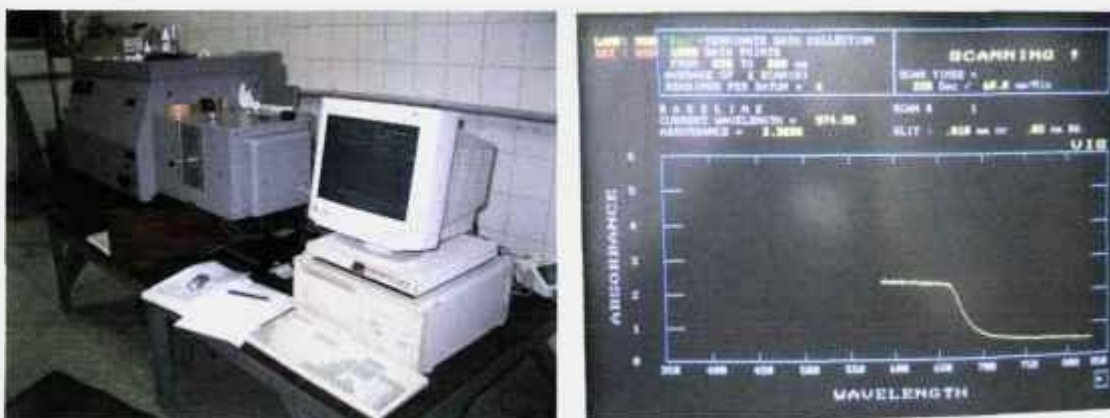


Figura 3: Espectrofotômetro Cary 17 (Varian- USA) do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Óptica do CLA-IPEN.

Inicialmente, foi obtido o espectro de absorção da rodamina ácida B diluída em água destilada, assim como o espectro do *S. mutans* antes da associação com a rodamina.

Logo após, foram obtidos espectros de absorção da rodamina ácida B associada ao *S. mutans* a fim de verificar a interação bactéria/corante. Foi realizada a espectroscopia após o PIT (tempo de pré-irradiação) de 5 minutos e após a irradiação por 3 e 5 minutos. O PIT corresponde ao tempo necessário para que o corante entre em contato com a bactéria.

Em seguida, foi realizada a espectroscopia de absorção do *S. mutans* durante a PDT com doses fracionadas de 1 minuto cada ($D=5,84\text{J}/\text{cm}^2$), percorrendo os tempos de 1 a 5 minutos.

A concentração do corante assim como a quantidade de ufc/mL foram padronizados de acordo com a parte experimental sobre redução bacteriana

utilizada neste estudo. Antes de cada leitura, foi realizada a agitação da cubeta para a homogeneização da amostra.

O equipamento utilizado para a irradiação foi o Bright Lec II (MMOptics, São Carlos, SP, Brazil), constituído de um diodo emissor de luz azul de comprimento de onda de 470 (+/- 25) nm, diâmetro da saída do feixe de 12 mm, área da saída do feixe de 1,13 cm², potência óptica de 110 mW e intensidade de 97,4 mW/cm² (Figura 4).

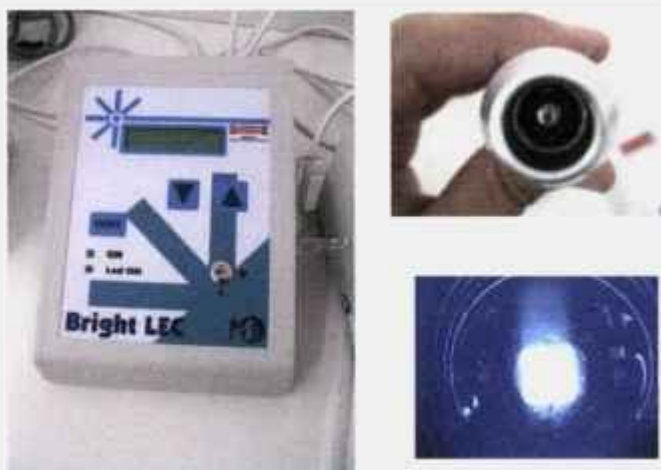


Figura 4: Bright Lec II (MMOptics, São Carlos - SP, Brazil).

Alíquotas de 80 μ l de *S. mutans* (ATCC25175) em estoque foram semeadas em Caldo de Triptone Soja (TSB) e incubadas a 37° C durante 48 horas para o crescimento bacteriano.

Após o crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos (Centrífuga Jouan, modelo A-14) (Figura 5), e o sobrenadante lavado duas vezes em solução tampão PBS (*Sodium Phosphate Buffer*, 0,1 M, pH 7,2).



Figura 5: Centrífuga Jouan, modelo A-14.

Após retirada do sobrenadante, as bactérias foram coletadas e colocadas em solução tampão PBS para a padronização do número de células.

Foram realizados os testes de catalase e análise das características morfotintoriais, através da coloração de Gram para confirmação da espécie.

A suspensão foi padronizada com escala 0,5 de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL). Após o preparo dos grupos, o número de ufc/mL foi de $1,35 \times 10^8$ ufc/mL pois foram utilizados 900 μ L de suspensão bacteriana adicionados de 100 μ L de solução tampão ou rodamina ácida B.

Após a padronização, a suspensão bacteriana foi dividida em cinco tubos de ensaio de acordo com os grupos abaixo:

Grupo A: controle – foram colocados 900 μ L de suspensão bacteriana mais 100 μ L de solução tampão.

Grupo B: LED – foram colocados 900 μ L de suspensão bacteriana mais 100 μ L de solução tampão e feita a irradiação por 5 minutos (Figura 6).



Figura 6: Irradiação do grupo B (LED).

Grupo C: rodamina – foram colocados 900 μ L de suspensão bacteriana mais 100 μ L de corante rodamina ácida B na concentração de 1%, para a concentração final de 0,1% de massa por volume ($M=1,72$ mM). O tempo de contato das bactérias

com o corante foi de 5 minutos. Os anexos de 1 a 3 ilustram a interação da rodamina com *S. mutans*.

Grupo D: PDT 3 minutos – foram colocados 900 μL de suspensão bacteriana mais 100 μL de corante rodamina ácida B na concentração de 1% para a concentração final de 0,1% de massa por volume ($M=1,72\text{ mM}$). O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos e o da irradiação de 3 minutos. A dose utilizada foi de $17,52\text{ J/cm}^2$ (Figura 7).



Figura 7: Irradiação do grupo D (PDT 3min).

Grupo E: PDT 5 minutos - foram colocados 900 μL de suspensão bacteriana mais 100 μL de corante rodamina ácida B na concentração de 1% para a concentração final de 0,1% de massa por volume ($M=1,72\text{ mM}$). O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos e o da irradiação de 5 minutos. A dose utilizada foi de $29,2\text{ J/cm}^2$ (Figura 8).



Figura 8: Irradiação do grupo E (PDT 5 min).

A irradiação foi realizada no sentido de baixo para cima do tubo de ensaio (Garcez, 2002).

Após os procedimentos, as suspensões bacterianas de cada grupo foram diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (Figura 9), e alíquotas de 100 μL de cada grupo foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo Triptone Soja Agar (TSA), para a contagem das células viáveis.



Figura 9: Diluições das suspensões de *S. mutans*.

Todos os procedimentos foram realizados no interior de fluxo laminar para evitar a contaminação com o meio externo (Figura 10). Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C , em ambiente contendo de 5 a 10% de CO_2 por 48 h.



Figura 10: Câmara de fluxo laminar do Laboratório de Microbiologia Oral (ICB-USP).

Após este período, foi realizada a contagem das ufc/mL, e os resultados submetidos à análise estatística (teste *t - student*, com nível de significância de 0,05).

5. RESULTADOS

O espectro de absorção da rodamina ácida B é mostrado na figura 11. É possível observar quatro bandas de absorção: duas menos intensas entre 350 nm e 400 nm e entre 400 nm e 470 nm. As bandas mais intensas situam-se no ultravioleta (< 350 nm) e entre 500 nm e 600 nm.

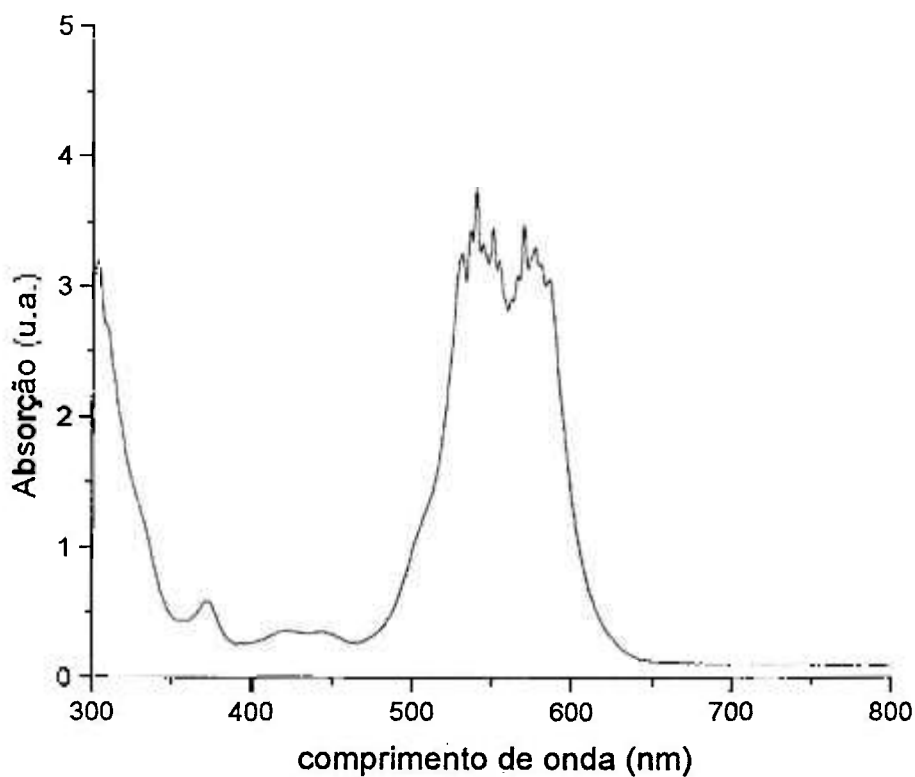


Figura 11: Espectro de absorção da rodamina ácida B.

A figura 12 mostra o espectro de absorção entre $\lambda = 300$ e 500 nm da rodamina ácida B a $0,1\%$ ($M = 1,72$ mM); do *S. mutans* + rodamina após tempo de pré-irradiação de 5 minutos (PIT); do *S. mutans* + rodamina após PDT por 3 min ($D = 17,52$ J/cm²) e após PDT por 5 min ($D = 29,2$ J/cm²). Foi possível observar uma diminuição da absorção após a associação da rodamina com o *S. mutans*, porém, após a PDT ocorreu um aumento dessa absorção. Não foi possível observar diferenças significativas no espectro de absorção entre os tempos de 3 e 5 minutos.

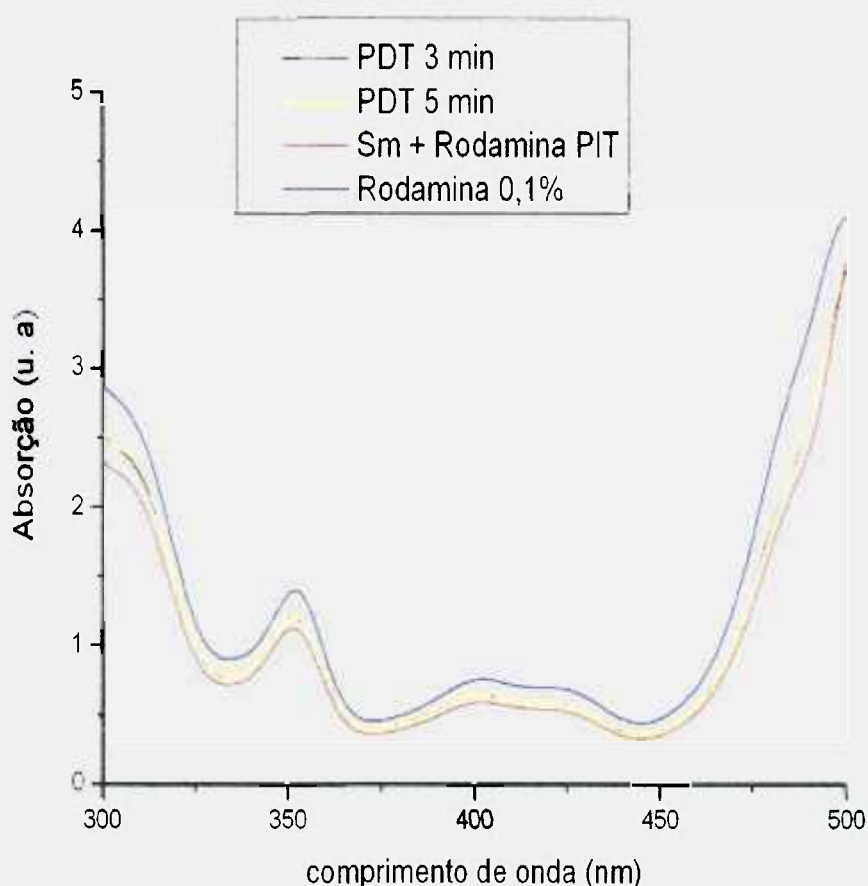


Figura 12: Rodamina 0,1%: Espectro de absorção da rodamina ácida B a 0,1%; SM+rodamina PIT: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após tempo de pré-irradiação de 5 minutos; PDT 3 minutos: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após PDT por 3 minutos; PDT 5 minutos: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após PDT por 5 minutos.

A figura 12 mostra o espectro de absorção entre $\lambda = 300$ e 500 nm da rodamina ácida B a $0,1\%$ ($M = 1,72$ mM); do *S. mutans* + rodamina após tempo de pré-irradiação de 5 minutos (PIT); do *S. mutans* + rodamina após PDT por 3 min ($D = 17,52$ J/cm²) e após PDT por 5 min ($D = 29,2$ J/cm²). Foi possível observar uma diminuição da absorção após a associação da rodamina com o *S. mutans*, porém, após a PDT ocorreu um aumento dessa absorção. Não foi possível observar diferenças significativas no espectro de absorção entre os tempos de 3 e 5 minutos.

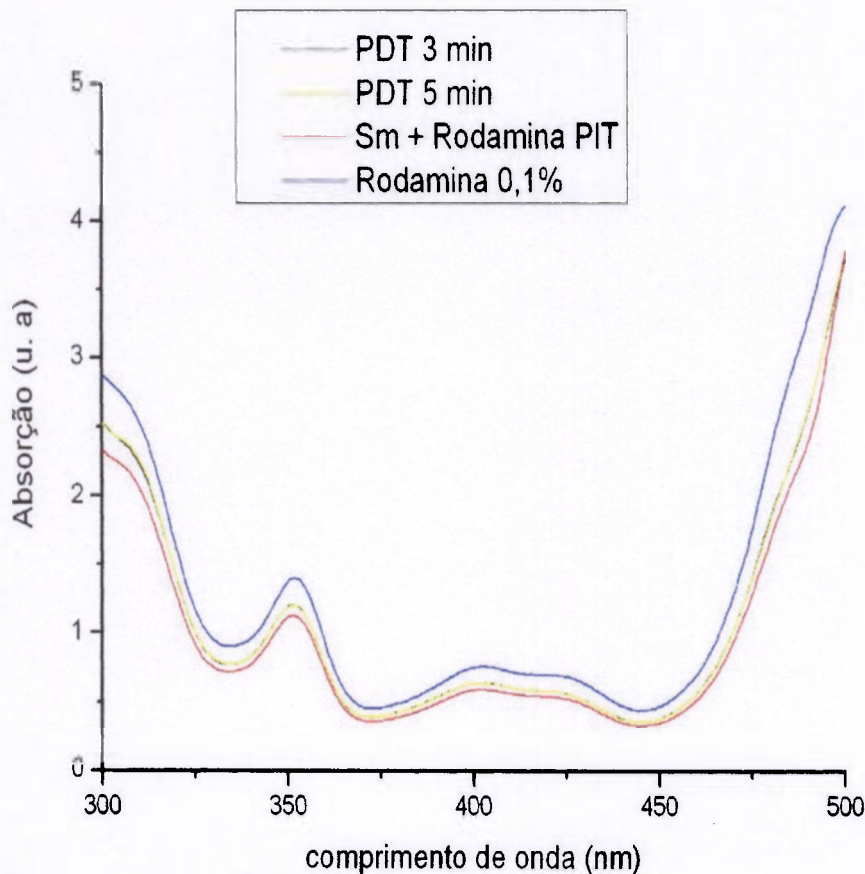


Figura 12: Rodamina 0,1%: Espectro de absorção da rodamina ácida B a 0,1%; SM+rodamina PIT: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após tempo de pré-irradiação de 5 minutos; PDT 3 minutos: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após PDT por 3 minutos; PDT 5 minutos: Espectro de absorção do *S. mutans* + rodamina após PDT por 5 minutos.

A figura 13 ilustra a absorção do *S. mutans* durante a PDT com doses fracionadas percorrendo os tempos de 1 a 5 minutos. Foi possível observar um aumento da absorção em $\lambda = 470$ nm nos dois minutos iniciais e depois uma estabilização na absorção até os 5 minutos.

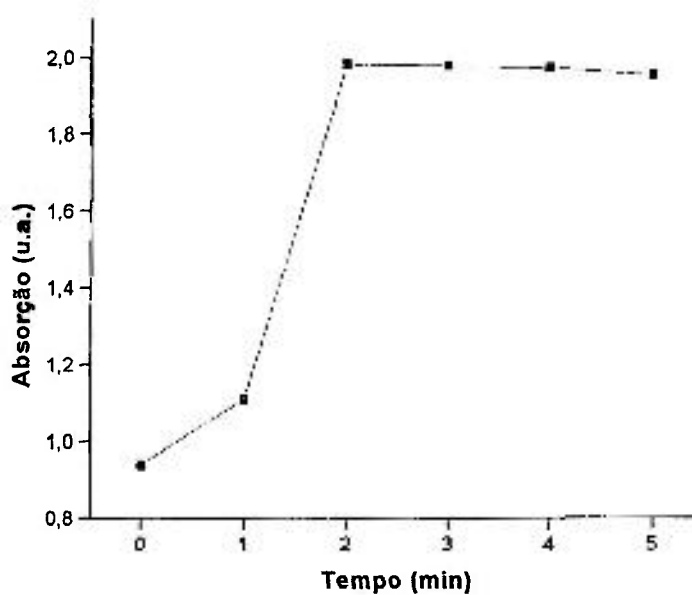


Figura 13: Gráfico da absorção do *S. mutans* em $\lambda = 470$ nm durante a PDT de 1 a 5 minutos.

A figura 14 mostra as alterações na absorção da rodamina ácida B após a associação com *S. mutans* e após a PDT. De acordo com o espectro de absorção, as mudanças ocorreram no comprimento de onda de 280 a 300 nm. No comprimento de onda utilizado ($\lambda = 470$ nm) não foi possível observar nenhuma alteração significativa no espectro de absorção.

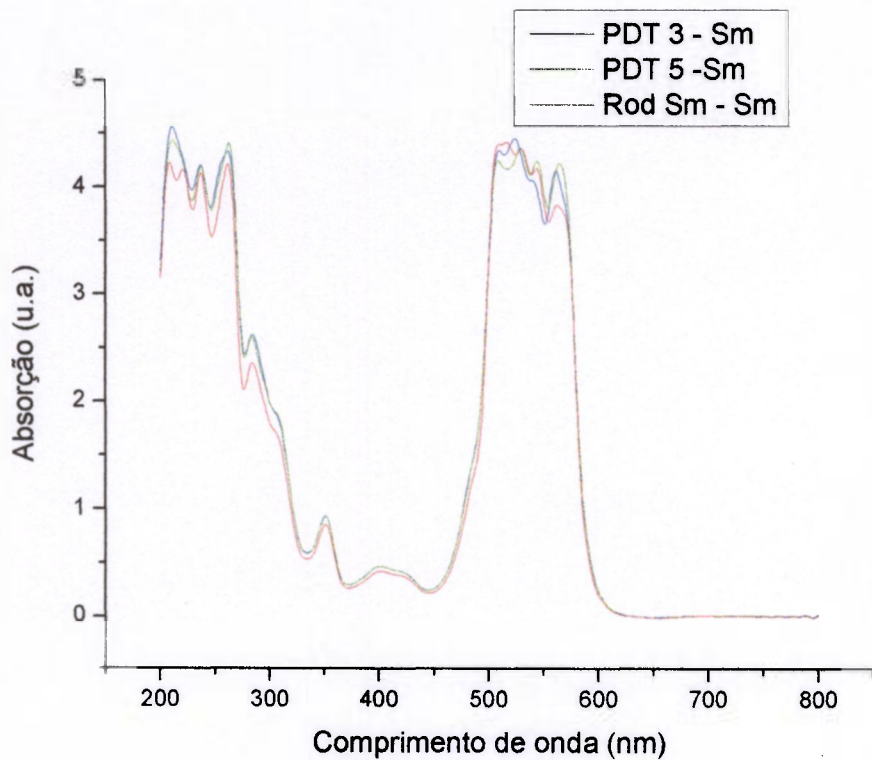


Figura 14: Alterações na absorção da rodamina ácida B após associação com *S. mutans* e após PDT. PDT 3 – SM: Espectro de absorção da rodamina após a PDT por 3 minutos; PDT 5 – SM: Espectro de absorção da rodamina após PDT por 5 minutos; Rod SM – SM: Espectro de absorção da rodamina após o tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

A figura 15 mostra o espectro de absorção do *S. mutans* antes da associação com a rodamina, após a associação com a rodamina por 5 minutos (PIT), e após a PDT por 3 e 5 minutos. Foi possível observar diferenças nas bandas de absorção ópticas entre $\lambda = 200$ e 500 nm após a associação do *S. mutans* com a rodamina e após a PDT por 3 e 5 minutos. Houve um aumento da absorção após a PDT por 3 minutos em todo o espectro. Após a PDT por 5 minutos houve uma queda de absorção entre $\lambda = 280$ e 300 nm.

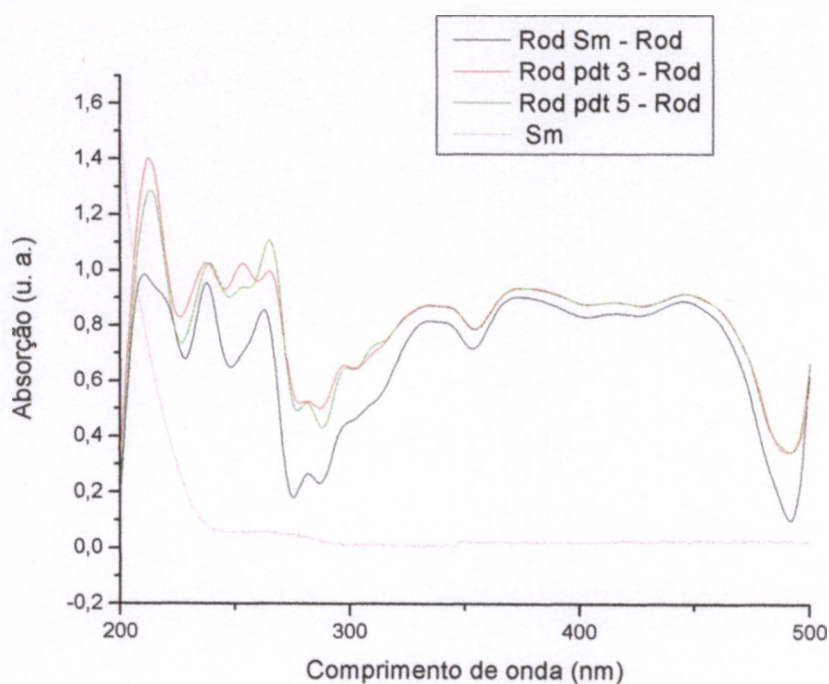


Figura 15: Alterações na absorção do *S. mutans* após a PDT. Rod Sm – Rod: Espectro de absorção do *S. mutans* após a associação com a rodamina por 5 minutos (PIT); Rod PDT 3 – Rod: Espectro de absorção do *S. mutans* após a PDT por 3 minutos; Rod PDT 5 – Rod: Espectro de absorção do *S. mutans* após a PDT por 5 minutos; Sm: Espectro de absorção do *S. mutans* antes da associação com a rodamina.

A figura 16 representa o número de células viáveis de *S. mutans* antes e após a PDT.

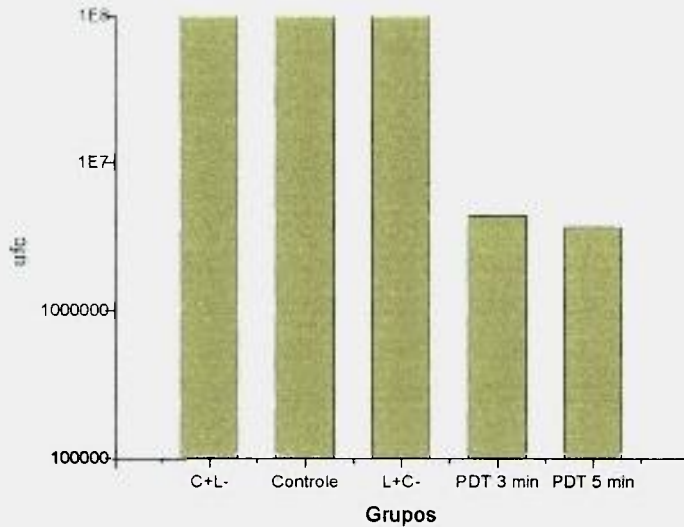


Figura 16: Número de células viáveis de *S. mutans* nos grupos.

C+L-: grupo rodamina

Controle: grupo controle

L+C-: grupo LED

PDT 3 min: grupo PDT 3 minutos

PDT 5 min: grupo PDT 5 minutos

A figura 17 representa o número de células viáveis, em porcentagem, de *S. mutans* antes e após a PDT.

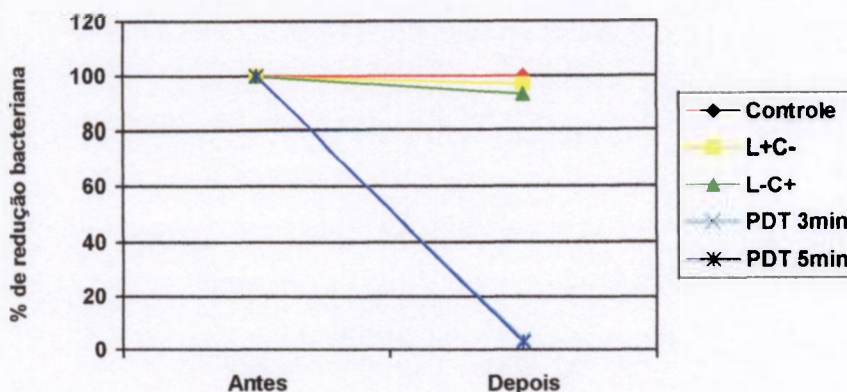


Figura 17: Número de células viáveis, em porcentagem, de *S. mutans* antes e após a PDT.

As suspensões bacterianas expostas somente ao fotossensibilizador rodamina ácida B durante 5 minutos não apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*.

As suspensões bacterianas expostas somente à irradiação por 5 minutos também não apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*.

As suspensões bacterianas expostas à PDT por 3 minutos apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*. O número total de bactérias viáveis foi de $4,41 \times 10^6$ ufc/ml, que corresponde à redução bacteriana de 96,74%.

As suspensões bacterianas expostas à PDT por 5 minutos apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*. O total de bactérias viáveis foi de $3,7 \times 10^6$ ufc/ml, que corresponde à redução bacteriana de 97,26%.

A análise estatística mostrou que a terapia fotodinâmica com um diodo emissor de luz em $\lambda = 470$ nm e rodamina ácida B como fotossensibilizador foi significativamente eficiente em reduzir o número de células viáveis de *S. mutans*. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas comparando-se as doses de $17,52 \text{ J/cm}^2$ ($\Delta t = 3$ min) e $29,2 \text{ J/cm}^2$ ($\Delta t = 5$ min).

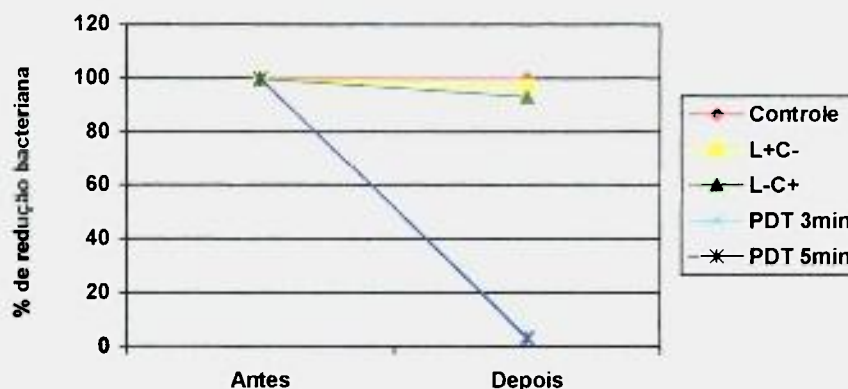


Figura 17: Número de células viáveis, em porcentagem, de *S. mutans* antes e após a PDT.

As suspensões bacterianas expostas somente ao fotossensibilizador rodamina ácida B durante 5 minutos não apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*.

As suspensões bacterianas expostas somente à irradiação por 5 minutos também não apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*.

As suspensões bacterianas expostas à PDT por 3 minutos apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*. O número total de bactérias viáveis foi de $4,41 \times 10^6$ ufc/ml, que corresponde à redução bacteriana de 96,74%.

As suspensões bacterianas expostas à PDT por 5 minutos apresentaram redução na viabilidade dos *S. mutans*. O total de bactérias viáveis foi de $3,7 \times 10^6$ ufc/ml, que corresponde à redução bacteriana de 97,26%.

A análise estatística mostrou que a terapia fotodinâmica com um diodo emissor de luz em $\lambda = 470$ nm e rodamina ácida B como fotossensibilizador foi significativamente eficiente em reduzir o número de células viáveis de *S. mutans*. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas comparando-se as doses de $17,52 \text{ J/cm}^2$ ($\Delta t = 3$ min) e $29,2 \text{ J/cm}^2$ ($\Delta t = 5$ min).

6. DISCUSSÃO

Apesar do caráter multifatorial da doença cárie, é conhecido na literatura que a redução dos microorganismos patogênicos da superfície dental constitui uma das principais estratégias de prevenção e controle da doença (MILLER, 1890; GIBBONS e HAY, 1988; MARCOTTE e LAVOIE, 1998; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001).

Várias terapias têm sido empregadas para a prevenção da doença cárie e incluem o uso de agentes quimioterápicos e quimioprolifáticos ((LASTER e LOBENE, 1990; JENKINS *et al.*, 1991; SCHEAEKEN *et al.*, 1991; MELBERG *et al.*, 1991), *lasers* em alta intensidade pela geração de calor (MORITZ *et al.*, 1997; MAIORANA *et al.*, 2002; GUTKNECHT *et al.*, 2002; CORTES, 2003), ou a terapia fotodinâmica (VENEZIO *et al.*, 1985; OKAMOTO *et al.*, 1992; DOBSON e WILSON, 1992; WILSON e MIA, 1993; WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; WALSH, 1997; ROVALDI *et al.*, 2000; KÖMERIK e WILSON, 2002; SEAL *et al.*, 2002; MATEVSKI *et al.*, 2003).

A maioria dos agentes quimioprolifáticos consiste de antimicrobianos de amplo espectro (GIERTSEN *et al.*, 1989), porém, a utilização de tais agentes pode causar um desequilíbrio ecológico desfavorável levando ao desenvolvimento de infecções oportunistas.

Outro problema em relação aos agentes antimicrobianos tradicionais é que existem relatos na literatura de que estes agentes podem levar à resistência bacteriana (COURVATIN, 1996). Até o presente momento, não foram encontrados registros sobre resistência bacteriana à PDT.

A terapia fotodinâmica surge nesse cenário como uma alternativa para a redução de microorganismos patogênicos, como é o caso do *S. mutans*, um dos principais patógenos envolvidos com o aparecimento e desenvolvimento da doença cárie.

Neste estudo, foram obtidos bons resultados na redução de *S. mutans*, utilizando um diodo emissor de luz azul de $\lambda=470$ nm associado ao fotossensibilizador rodamina ácida B. Com uma densidade de energia de $17,52$ J/cm² (tempo de exposição de 3 minutos), a redução bacteriana foi de 96,74%, enquanto que para uma dose de $29,2$ J/cm² (tempo de exposição de 5 minutos), a morte de *S. mutans* foi de 97,26%.

A rodamina ácida B é utilizada na Odontologia como evidenciador de cárie e esta é a primeira vez que seu uso é reportado como fotossensibilizador. Para um tratamento que é superficial, como no caso de infecções locais, é mais importante, para obtenção do efeito fotodinâmico, a capacidade de ativar o fotossensibilizador, do que a utilização de maiores comprimentos de onda, onde é possível uma maior penetração tecidual. A rodamina ácida B apresenta uma absorção no azul mais intensa do que no vermelho em $\lambda= 660$ nm, que é o comprimento de onda disponível comercialmente ao adquirir-se um *laser* em baixa intensidade. Já que o LED azul com $\lambda= 470$ nm é utilizado clinicamente para procedimentos de clareamento dental e fotopolimerização de resinas, optou-se pela utilização desta fonte de luz para fotossensibilização da rodamina. Após a análise da espectroscopia foi possível observar uma mudança no espectro de absorção da rodamina após a associação desta com o *S. mutans*. Após esta associação ocorreu uma diminuição na absorção, que voltou a subir logo após a irradiação (Fig. 12). Entre os tempos de 3 e 5 minutos, não houve nenhuma mudança no espectro de absorção em $\lambda= 470$ nm, o que sugere que durante este tempo o FS não estaria perdendo sua eficiência (Fig. 13). Após a PDT por 5 minutos ocorreu uma diminuição da absorção entre $\lambda=280$ e 300 nm, que poderia sugerir alterações em algumas das estruturas da célula bacteriana, já que após esse período ocorreu a morte de 97, 26% do total das células viáveis de *S. mutans* (Fig. 15).

De acordo com os resultados obtidos sobre a redução bacteriana não foram observadas diferenças estatísticas significativas na redução de *S. mutans* para as doses de $17,52$ J/cm² e $29,2$ J/cm², correspondendo a tempos de irradiação de 3 e 5 minutos. A espectroscopia de absorção do *S. mutans*,

associado ao FS, durante a PDT nos tempos de 1 a 5 minutos mostrou um aumento da absorção nos dois primeiros minutos e depois uma estabilização até os 5 minutos. Esses resultados sugerem que pode ser possível conseguir um efeito bactericida significativo com tempos de irradiação entre 1 e 2 minutos e que o fracionamento da dose pode ser importante, já que ocorre um aumento da taxa de absorção nos dois primeiros minutos. Poderiam ser obtidos resultados diferentes se fossem comparados regimes de doses contínuas, por exemplo, a irradiação durante 3 minutos consecutivos, com o regime de doses fracionadas, com 3 doses de 1 minuto cada, seguidas de intervalos de alguns minutos entre as irradiações.

Segundo o estudo de MPHIL *et al.*, 2004, o regime de doses fracionadas possibilita um aumento da taxa de oxigenação imediatamente após o intervalo entre as irradiações, que poderia ser traduzido como uma re-oxigenação da célula, ou seja, um aumento da geração de oxigênio, importante para a eficácia da terapia fotodinâmica.

Derivados de hematoporfirina, utilizados para terapia fotodinâmica de tumores foram utilizados com a finalidade de se obter efeito bactericida contra espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* utilizando uma fonte de luz com potência de 300 mW (VENEZIO *et al.*, 1985) com resultados positivos para todas as bactérias testadas, porém, não foram apresentados os números de bactérias mortas pela terapia. Neste trabalho, os autores mostraram que uma fonte de luz que não seja coerente é possível, porém, devido à sua baixa energia, necessita de um longo tempo de exposição o que clinicamente não é viável.

Nos últimos anos, a terapia fotodinâmica tem sido utilizada com a finalidade de se obter efeito bactericida sobre microorganismos patógenos bucais. Para tanto, têm sido utilizados fotossensibilizadores cuja coloração variam do azul, púrpura e verde e que são fortemente absorvidos a $\lambda=630$ nm, associados a *lasers* em baixa intensidade que emitem no vermelho visível (OKAMOTO *et al.*, 1992; WILSON e MIA, 1993; WILSON *et al.*, 1995).

Alguns estudos têm demonstrado resultados efetivos mesmo quando as bactérias se encontram sob a forma de biofilmes, como ocorre na placa subgengival (DOBSON e WILSON, 1992; BURNS *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; SEAL *et al.*, 2002), ou mesmo quando as bactérias estão embebidas em matriz de colágeno e sob dentina desmineralizada (BURNS *et al.*, 1995).

A terapia fotodinâmica foi sugerida como uma técnica para a esterilização de uma lesão de cárie previamente à restauração, utilizando TBO, associado a um laser de HeNe ($\lambda=632,8$ nm), com 7,3 mW de potência e densidade de energia de $33,6$ J/cm² (BURNS *et al.*, 1993; WALSH, 1997; SEAL *et al.*, 2002; ZANIN *et al.*, 2002).

No presente estudo, foi utilizado um fotossensibilizador que pertence à família das rosaminas, cujas bandas de absorção situam-se entre 350 e 600 nm, associado a um diodo emissor de luz azul de $\lambda=470$ nm. Este fotossensibilizador é utilizado dentro da Odontologia em soluções evidenciadoras de cárie, o que viabilizaria a redução de bactérias cariogênicas *in situ*, minimizando a quantidade de tecido sadio a ser removido durante um preparo cavitário convencional. A utilização de um LED de comprimento de onda de 470 nm é devido ao fato de que este equipamento já existe comercialmente para procedimentos de clareamento dental e polimerização de resinas.

O *S. mutans* não possui uma porfirina autofluorescente, ao contrário de algumas bactérias como o *Actinomyces odontolyticus*, *Propionibacterium acnes* e *Porphyromonas gingivalis* que sintetizam um fotossensibilizador natural, a photoporfirina IX, que é capaz de ser sensibilizada por um laser de HeNe de $\lambda=632$ nm (KÖNIG, 2000). Portanto, para um estudo com *S. mutans* é necessário o uso de um corante específico de acordo com a fonte de luz a ser utilizada.

Após a penetração no tecido, a coerência da luz é perdida em alguns décimos de milímetros. Ao contrário de uma fonte de luz monocromática, o LED é capaz de produzir luz com uma banda espectral mais abrangente (BRANCALEON e MOSELEY, 2002; JUZENIENE *et al.*, 2004).

Mesmo para o tratamento de tumores, onde teoricamente necessita-se de uma maior penetração tecidual, fontes de luz não coerentes têm sido utilizadas apresentando efeitos similares aos do *laser* em baixa intensidade (WITHEHURST *et al.*, 1995; MOSELEY, 1996; SOLER *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 2003; JUZENIENE *et al.*, 2004).

Para tratamentos que são superficiais, como é o caso da desinfecção de preparos cavitários ou redução de *S. mutans* presentes em biofilmes, não é necessário que a fonte de luz seja proveniente de um *laser*, já que não é necessária uma grande penetração tecidual, e sim que o fotossensibilizador possua uma banda espectral adequada à fonte de luz utilizada. Sendo assim, a do LED pode ser utilizada para este fim, e apresenta como vantagens o fato de serem equipamentos compactos, relativamente estáveis, acessíveis, fáceis de operar e de manutenção simples.

Não foram encontrados até o momento, trabalhos na literatura referindo-se à ação bactericida de LEDs associados a agentes fotossensibilizadores. Os resultados deste estudo mostraram que a rodamina ácida B associada a um LED de $\lambda=470$ nm pode ser utilizada como agente fotossensibilizador dentro do princípio da terapia fotodinâmica, com a finalidade de sensibilizar microorganismos patógenos da cavidade oral, neste caso, o *S. mutans*.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial da terapia fotodinâmica em aplicações clínicas como a desinfecção de canais, bolsas periodontais, lesões de cárie e regiões de perimplantites. Todavia, outros estudos devem ser conduzidos no sentido de adequar parâmetros para que a terapia fotodinâmica possa ser utilizada clinicamente, pois é conhecido que as bactérias sob a forma de biofilmes e em lesões de cárie são mais resistentes do que as crescidas em meio de cultura.

Estudos *in vitro* mostraram a ação bactericida contra microorganismos bucais de fotossensibilizadores cuja coloração variam do azul, púrpura e verde e que são fortemente absorvidos em $\lambda= 630$ nm, associados a *lasers* em baixa

intensidade (VENEZIO *et al.*, 1985; WILSON *et al.*, 1992; OKAMOTO *et al.*, 1992; DOBSON e WILSON, 1992; WILSON e MIA., 1993; BURNS *et al.*, 1993; WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WALSH, 1997; DÖRTBUDAK *et al.*, 2001; SEAL *et al.*, 2002; KÖNIG, 2002; ZANIN *et al.*, 2002).

Porém, nesses trabalhos, a terapia fotodinâmica é sempre realizada com a utilização de um *laser* em emissão no vermelho visível do espectro eletromagnético, o que explica o uso de fotossensibilizadores capazes de serem absorvidos por estes comprimentos de onda.

Para este estudo, foi escolhido como fonte de luz um diodo emissor de luz azul por possuir comprimento de onda de 470 nm, situando-se em uma das bandas de absorção do fotossensibilizador utilizado.

A rodamina ácida B é utilizada como evidenciadora de cárie pela sua capacidade de penetrar na dentina cariada pela quebra irreversível das ligações intermoleculares e, portanto, corando a região de dentina infectada e desorganizada (FUSAYAMA, 1997; FUSAYAMA, 1998).

O *S. mutans* mostrou ser capaz de absorver a rodamina ácida B e ser fotossensibilizado por um LED azul de $\lambda = 470$ nm. Dessa forma, através da terapia fotodinâmica, seria possível a eliminação das bactérias cariogênicas *in situ*, diminuindo a quantidade de tecido sadio a ser removido e, conseqüentemente, contribuindo para a preservação do elemento dental restaurado.

É difícil o estabelecimento de parâmetros de comparação com estudos anteriores, já que a maioria dos trabalhos sobre redução bacteriana com PDT é realizada com *lasers* e, *lasers* e LEDs possuem algumas diferenças básicas no que diz respeito às suas características de cromaticidade, coerência e potência luminosa.

A porcentagem de redução bacteriana obtida com a rodamina ácida B, quando as amostras foram irradiadas por 3 e 5 minutos, foi de 96,74% e 97,26%

respectivamente. Esses resultados ficaram bem próximos aos encontrados em trabalhos anteriores utilizando o *laser* em baixa intensidade (BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; ZANIN *et al.*, 2002).

Maiores estudos clínicos ainda devem ser conduzidos antes de tornar a terapia fotodinâmica aplicável na clínica diária. Porém, os resultados deste estudo sugerem que a PDT apresenta um bom potencial para uso clínico, já que um dos grandes problemas atuais é a resistência bacteriana a agentes químicos, assim como o desequilíbrio da microflora pelo uso de agentes de amplo espectro.

A PDT pode ser confinada à área da lesão pela aplicação cuidadosa do corante e restrição da irradiação somente ao local de interesse.

A utilização da rodamina ácida B como FS é devido ao fato de que este composto já é utilizada clinicamente para evidenciar dentina cariada. A terapia fotodinâmica possibilitaria a morte de bactérias cariogênicas *in situ*. Como é difícil diferenciar clinicamente a dentina sadia da dentina infectada, a PDT poderia auxiliar na esterilização do preparo cavitário previamente à restauração, como já proposto por estudos anteriores utilizando outros FS e *laser* em baixa intensidade (BURNS *et al.*, 1993).

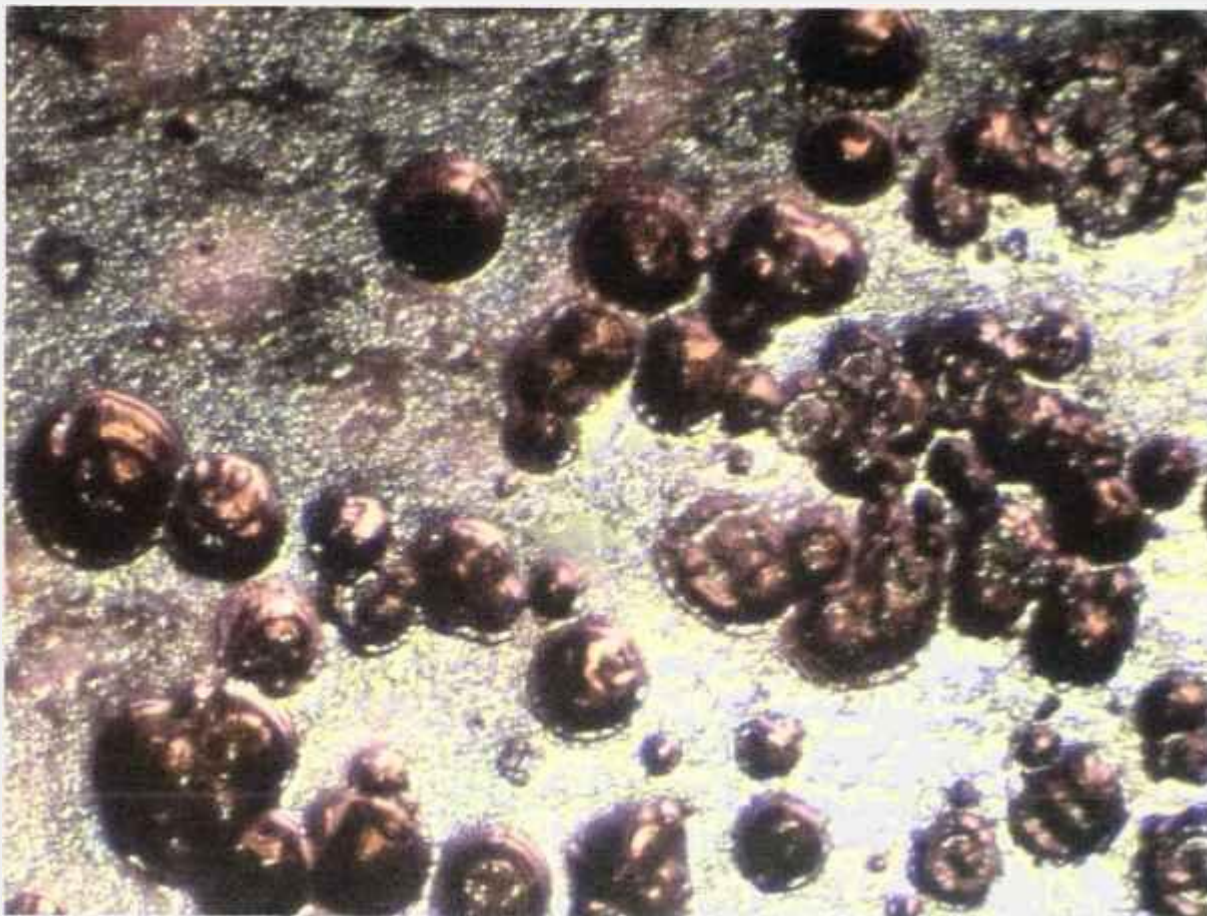
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS:

- Pesquisar o mecanismo de morte bacteriana através da PDT;
- Avaliar se há ou não indícios de resistência bacteriana à PDT.

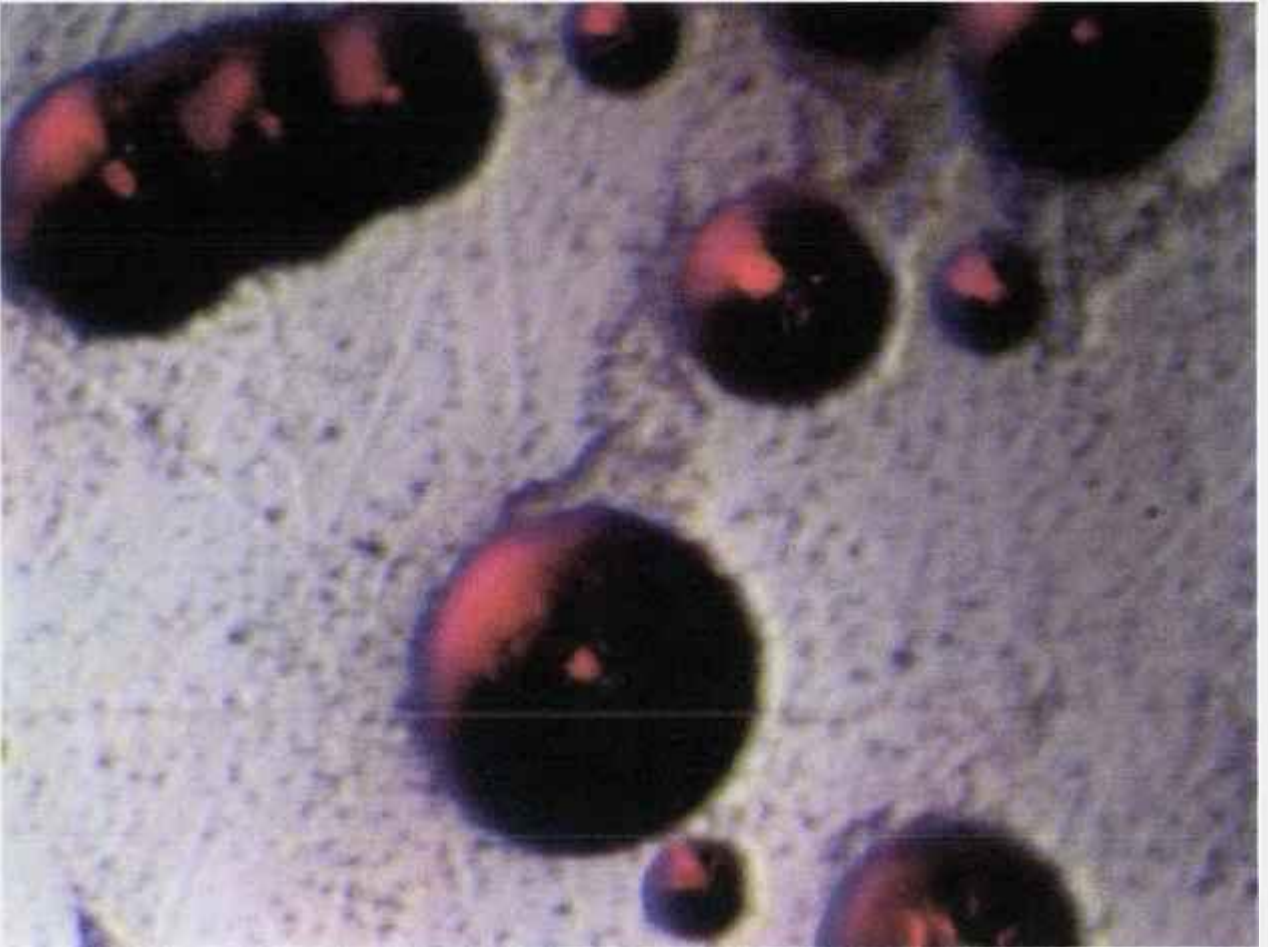
CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

1. A rodamina ácida B na concentração de 1,72 mM associada a um diodo emissor de luz de $\lambda = 470$ nm, é capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis de *S. mutans*, *in vitro*;
2. Comparando-se as densidades de energia utilizadas nos tempos de 3 e 5 minutos, não houve diferença estatisticamente significativa na redução de *S. mutans* entre os grupos D e E.
3. A espectroscopia de absorção óptica sugere que há interação entre *S. mutans* e rodamina ácida B, e a absorção óptica em $\lambda = 470$ nm sofre alterações quando a dose é fracionada.

ANEXOS

Anexo 1 : Fotografias em pequeno aumento de colônias de *S. mutans* em placas de Petri coradas com o fotossensibilizador rodamina ácida B.



Anexo 2 : Fotografias em médio aumento de colônias de *S. mutans* em placas de Petri coradas com o fotossensibilizador rodamina ácida B.



Anexo 3 : Fotografias em grande aumento de colônias de *S. mutans* em placas de Petri coradas com o fotossensibilizador rodamina ácida B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHMANOV, S.A.; CHERNIAEVA, E.B.; Photodynamic action of laser emission on biomolecules and cells. The mechanism of photodynamic action and the molecular and cell levels. **Modern problems of laser physics**, 3a. Ed. Moscou, 1993.

ALLISON, R.R.; DOWNIE G.H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v.1, p.27-42, (2004).

BENSON, R.C.JR.; FARROW, G.M.; KINSEY, J.H.; CORTESE D.A.; ZINCKE, H.; UTZ, D.C. Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative. **Mayo Clin Proc**, v. 57, p. 548-55, 1982.

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

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v.29, p. 192-97, 1995.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J Dent**, v. 22, p. 273-78, 1994.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Laser-induced killing of photosensitized cariogenic bacteria. **J Dent Res**, v. 71, p. 675, 1992.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. **J Med Microbiol**, v. 38, p. 401-05, 1993.

CLARK, C. BRYDEN, A.; DAWE, R. MOSELEY, H; FERGUSSON, J.; IBBOTSON, S.H. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions:

outcome and comparison of light sources. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 19:134-41, 2003.

CORTES, M. The elimination of bacteria and biofilms in periodontal disease via thermal laser. **Intl Congress Series** 1248, p. 359-362, 2003.

COURVATIN, P. Evasion of antibiotic action by bacteria. **J Antimicrob Chemoter**, v. 37, p. 855-69, 1996.

CRAFORD, M.; HOLONYAK, N.; FREDERICK, K. In pursuit of the ultimate lamp. **Sci Am**, v. 2, p. 284-62, 2001.

DE ROSA, M. C.; CRUTHCLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews** 223-234 (2002), 351, 371.

DOBSON, J. WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archs Oral Biol**, v. 37, p. 883-87, 1992.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, 1993; 58:895-900.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, W. B.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. " Review: photodynamic Therapy". **J National Cancer Institute**, v. 90, 12, 1998.

FINSEN, N.F. **Phototherapy**. London: Arnold; 1901.

FLOYD, T. L. In: **Electric circuit fundamentals**. 2a. Ed. Merril: 1991.

FUSAYAMA, T. Clinical guide for removing caries using a caries-detecting solution. **Quintessence Intl**, v. 19, p. 347-401, 1998.

FUSAYAMA, T. The process and results of revolution in dental caries treatment. **Intl Dental J**, 47(3):157-66, 1997.

GARCEZ SEGUNDO, A. *Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico. Dissertação de mestrado. Mestrado Profissionalizante em Lasers em Odontologia.* IPEN/FOUSP, 2002.

GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. Human salivary acidic proline-rich-proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatite surfaces. **Infect Immun**, v. 56, n. 2, p.439-45, 1988.

GIERTSEN, E.; SCHEIE, A.; RÖLLA, G. Plaque inhibition by a combination of zinc citrate and sodium lauryl sulfate. **Caries Res**, v.23, p. 278-83, 1989.

GOODSON, J.M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J Dent Res**, v. 68, p. 1625-32, 1989.

GREBENOVÁ, D.; KUZELOVÁ, K.; SMETANA, K.; PLUSKALOVÁ, M.; CAJTHAMLOVÁ, H.; MARINOV, I.; FUCHS, O.; SOUCEK, J.; JAROLIM, P.; HRKAL, Z. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 69, p. 71-85, 2003.

GUTKNECHT, N.; ALT, T.; SLAUS, G.; BOTTENBERG, P.; ROSSEEL, P.; LAUWERS, S.; LAMPERT, F. A Clinical comparison of the bactericidal effect of the diode laser and 5% sodium hypochlorite in necrotic root canals. **J Oral lasers Applications**, v. 2, p.151-57, 2002.

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

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses. Effects of 4-day plaque regrowth. **J Clin Periodontol**, v.18, p. 145-8, 1991.

JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; MA, L.W.; IANI, W.; MOAN, J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, Oct, 2004, Published on line.

KANOFISKY, J.R.; SIMA, P.D. Preferential cytotoxicity for multidrug-resistant K562 cells using the combination of a photosensitizer and a cyanine dye. **J Photochem Photobiol, B: Biology**, v. 57, p. 136-144, 2000.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 3-7, 2004.

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

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B: Biology** 66 (2002), 89-106.

KÖNIG, K.; TESCHKE, M.; SIGUSCH, B.; GLOCKMANN, E.; EICK, S.; PFISTER, W. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cell Mol Biol**, 46 (7), 1297-303, Nov, 2000.

LASTER, L.L.; LOBENE, R.R. New perspectives on sanguinaria clinicals: Individual toothpaste and oral rinse testing. **J Can Dent Assoc**, v. 56, p. 19-30, 1990.

LERMAN, S. **Historia de la odontología y su ejercicio legal**. 2. ed. Buenos Aires: Mundi, 1964.

LOESCHE, W.J. **Cárie dental – Uma Infecção Tratável**. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 1993.

MAIORANA, C.; SALINA, S.; SANTORO, F. Treatment of perimplantitis with diode laser: a clinical report. **J Oral Lasers Applications**, v.2, p. 121-27, 2002.

MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p. 43-48, 2004.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v. 62, n. 1, p. 71- 109, Mar, 1998.

MATEVSKI, D.; WEERSINK, R.; TENEBBAUM, H. C.; WILSON, B.; ELLEN, R. P.; LÉPINE, G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. **J Periodontol Res**, 2003:38, 428-35.

MEDEIROS, U.V. Controle clínico da doença cárie. In: GALAN Jr. J.; NAMEN, F.M. **Dentística Restauradora - O essencial para o clínico**. Ed. Santos, 1. ed.; p. 7-19, 1998.

MELBERG, J.R.; BLAKE-HASKINS J.; PETROU, I.D.; GROTE, N.E. Remineralization in situ from a triclosan/ copolymer/ fluoride dentifrice. **J Dent Res**, v. 70, p. 1441-3, 1991.

MILLER, W.D. **The microorganisms of the human mouth**. Edited by KÖNIG, K., KARGER, S., BASEL, p. 205, 1890 (reprinted 1973).

MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol, A: Biology**, v. 57, p. 1-13, 2000.

MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; DOERTBUDAK, O.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; SCHAUER, P. SPERR, W. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: A pilot study. **J Clin Laser Med Surg**, v.15, p. 33-37, 1997.

MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; DOERTBUDAK, O.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; SCHAUER, P. SPERR, W. Irradiation of infected root canals with diode laser in vivo: results of microbiological examinations. **Lasers Surg Med**, v. 21; 221-26; 1997.

MOSELEY, H. Total effective fluence: a useful concept in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 11, 139-43, 1996.

MPHIL, M. A.; STRINGER, M. R.; CRUSE-SAWYER, J. E.; BROWN, S. B. Fluence-rate effects upon m-THPC photobleaching in a formalin-fixed cell system. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p. 173-80, 2004.

NEWBRUM, E. **Cariologia**. 1^a. Ed. Santos. 1988.

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg Med**, 12:450-8, 1992.

OSCHNER, M. Photophysical and photobiological processes en the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol, B: Biology**, v. 39, p. 1-18, 1997.

RAAB, O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. **Z Biol** 1900; 39:524.

ROVALDI, C.R.; PIEVSKI, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemother**, Dec. 2000. p. 3364-67.

SANDERSON, D.R.; FONTANA, R.S.; LIPSON, R.L. BALDES, E.J. hematoporphyrin as a diagnostic tool. A preliminary report of new techniques. **Cancer**, v. 30, p. 1368-72, 1972.

SCHEAEKEN, M.J.M.; KELTJENS, H.M.A.M.; van der HOEVEN, J.S. Effects of fluoride and chlorhexidine on the microflora of dental root surfaces and progression of root-surface caries. **J Dent Res**, v. 2, p. 150-3, 1991.

SCHEIE, A.A. Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 68, p. 1609-16, 1989.

SEAL, G.J.; NG, Y.L.; SPRATT, D.; BHATTI, M.; GULABIVALA, K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilm in root canals. **Int Endodont J**, v.35, p. 268-74, 2002.

SOLER, A. M. ; ANGELL-PETERSEN, E.; WARLOE, T.; TAUSJO, J.; STEEN, H.B.; MOAN, J.; GIERCKSKY, K.E. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylenediaminetetracetic acid: a comparison of two light sources. **Photochem Photobiol**, v. 71: 724-729, 2000.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. Ed. Santos. 3^a. Ed. 2001.

TUBOY, A.M. A tecnologia de LEDs utilizada na fotopolimerização de materiais dentais. São Carlos: **Mmoptics**, 2003.

VENEZIO, F.R.; VINCENZO, C.D.; RANDALL, S.; REICHMAN, M.; ORIGINANO, T.; THOMPSON, K.; REICHMAN, OH. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n.1, January, 1985.

WALSH, L.J. The current status of low power laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J**, v.42, p. 302-06, 1997.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol**, v. 75, p. 299-306, 1993.

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol**, v. 78, p. 569-74, 1995.

WILSON, M; MIA, M. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**, v.22, p. 354-7, 1993.

WITHEHURST, C.; HUMPHRIES, J.D.; MOORE, J.V. Development of an alternative light source to lasers for photodynamic therapy: 2. Comparative in vivo tumour response characteristics. **Lasers Med Sci**, v. 10, p. 121-26, 1995.

ZANIN, I.C.J.; JR. BRUGNERA, A.; GONÇALVES, R.B. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. **Revista da APCD**, v. 56, p. 7-11, Supl, Junho, 2002.