



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

**EFEITO FOTODINÂMICO ANTIMICROBIANO SOBRE CEPAS DE
Staphylococcus spp. ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
ANTIBIOTICOTERAPIA PROLONGADA**

Michelle Miyabe

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilíria Salomão Feist

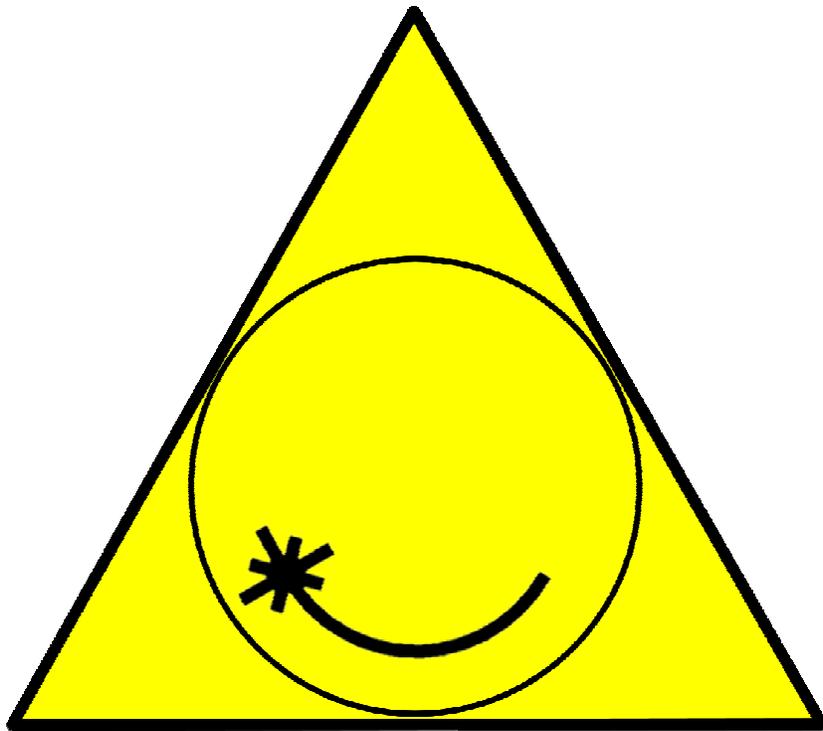
Co-orientador: Prof. Dr. Edson Puig Maldonado

**São Paulo
2007**



MESTRADO PROFISSIONALIZANTE

LASERS EM ODONTOLOGIA





INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

**EFEITO FOTODINÂMICO ANTIMICROBIANO SOBRE CEPAS DE
Staphylococcus spp. ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
ANTIBIOTICOTERAPIA PROLONGADA**

Michelle Miyabe

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilíria Salomão Feist

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Puig Maldonado

**São Paulo
2007**



DEDICATÓRIA

À Deus, que guia meus passos precisamente todos os dias.

Aos meus pais,

Mituchi e Graça,

que são meus amores, meus alicerces, minha formação, meus exemplos de vida.

Ao meu irmão Maurício pelo amor, cumplicidade e carinho sempre.

Obrigada por serem estas pessoas maravilhosas, pela dedicação integral e por serem os maiores incentivadores dos meus sonhos e objetivos.

À minha afilhada Júlia e sua irmã, Pietra , por serem uma alegria em minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Prof^a. Dr^a. Juliana Campos Junqueira,

Pela orientação de forma competente e dedicada, neste último ano no laboratório de microbiologia, acreditando e ajudando, por ter confiado em mim, pela paciência, por ser um exemplo de profissional em todos os sentidos, por ser um exemplo como pessoa, por ser admirável.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do curso de Mestrado Profissionalizante de Laser em Odontologia, Prof^a. Dr^a. Ilíria Salomão Feist, e ao meu co-orientador, do mesmo curso, Prof. Dr. Edson Puig Maldonado, que sempre me ajudaram quando a eles recorri.

Ao Centro de Lasers e Aplicações/ CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ IPEN e ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia/ LELO da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/ FOU SP.

Ao Mestrado Profissionalizante de Lasers em Odontologia.

Ao Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge, Professor Titular de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP, Campus de São José dos Campos, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim. Este trabalho não poderia ter acontecido sem sua colaboração.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, e ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof^a. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha.

A Prof^a. Dr^a. Martha Simões Ribeiro, do Centro de Lasers e Aplicações/ CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ IPEN, pela dedicação, dispondo-se em várias ocasiões a esclarecer dúvidas.

A Prof^a. Dr^a. Silvia Maria Rodrigues Querido, pela imensa colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado e especialmente pela amizade.

À aluna, do segundo ano de graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP Júnia Oliveira Barbosa, pela dedicação, pela imensa colaboração, pelo convívio e amizade.

Ao meu tio Vlademir Côrrea que contribuiu com seus conhecimentos neste trabalho.

À secretária do curso de Mestrado Profissionalizante de Laser em Odontologia, Andréa Malavazi por ser competente, dedicada e atenciosa, se desdobrando para poder sempre ajudar.

À secretária do Laboratório Especial de Lasers na Odontologia, Liliane de Souza, sempre dedicada e carinhosa, por ter feito sempre o possível para o bom funcionamento da clínica.

À Paula Silvestrini Anarelli Leite, Tatiana Cargnelutti e Eva Epelbaum, que se tornaram amigas durante o curso, pela companhia, por tudo que aprendemos juntas, pela dedicação e seriedade em todos os trabalhos que realizamos.

À todos os meus queridos colegas da Turma 7 do curso.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, especialmente à Graziella Nuernberg Brito, Edson Yukio Komiyama e Megg Aparecida Ribeiro, pelo convívio e por me ajudarem prontamente sempre que precisei.

Às amigas, Rachel Rezende Machado, Maria Teresa Soares D'Azevedo, Lucilei Lopes Bonato, Viviane Cínthia Andrade, Verônica Andrade Rosa, Fabiana Marcondes Bernardes Gil, Cristiane da Silva Santos, Renata Maria Pereira do Lago César, Camila Dias Guedes e Paula de Souza Prado presentes sempre e

que me incentivaram, e torceram por mim, especialmente para realização e finalização deste trabalho.

À minha secretária, Katiane Laisciele de Queiroz, pela dedicação e paciência por todos estes anos trabalhando juntas.

À todos que de alguma maneira contribuíram: Professores e funcionários do Centro de Lasers e Aplicações/ CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ IPEN. Laboratório Especial de Laser em Odontologia/ LELO da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/ FOU SP. Professores e funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP, Campus de São José dos Campos.

RESUMO

EFEITO FOTODINÂMICO ANTIMICROBIANO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS A ANTIBIOTICOTERAPIA PROLONGADA

Michelle Miyabe

Atualmente, com o desenvolvimento da terapia fotodinâmica, surge à possibilidade de um tratamento alternativo para a redução ou eliminação de microrganismos, podendo substituir o tratamento com antibióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada. Foram utilizadas 20 cepas de *Staphylococcus*, sendo 6 *S. epidermidis*, 5 *S. aureus*, 5 *S. schleiferi*, 2 *S. capitis*, 1 *S. haemolyticus* e 1 *S. lentus*. Cada cepa foi submetida a 5 condições experimentais: associação de laser e fotossensibilizador azul de metileno (L+F+), irradiação com laser (L+F-), tratamento com azul de metileno (L-F+), tratamento com solução fisiológica (L-F-) e tratamento com ciprofloxacina (antibiótico). Após o tratamento, foram realizadas diluições seriadas e culturas em ágar Infuso Cérebro-Coração. Após incubação, foi realizados a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e os dados submetidos à análise de variância. O grupo L+F+ apresentou redução significativa no número de UFC/mL em relação ao grupo L-F- para as 20 cepas estudadas. O percentual de redução microbiana variou de 99,97 a 100%. O antibiótico causou eliminação completa de *Staphylococcus* em 19 cepas. O uso isolado do azul de metileno também reduziu o número de microrganismos. Entretanto, o uso isolado do laser não apresentou efeito bactericida.

Concluiu-se que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução de todas as cepas de *Staphylococcus* estudadas.

ABSTRACT

THE EFFECT OF PHOTODYNAMIC ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY IN ISOLATES OF *Staphylococcus* spp. FROM PATIENTS UNDERGOING PROLONGED ANTIBIOTIC TREATMENT

Michelle Miyabe

Nowadays, the development of photodynamic antimicrobial chemotherapy has been permitted a new alternative treatment for reduction or elimination of microorganisms and it may be a substitute to the antibiotic therapy. The aim of this study was to evaluate the effects of photodynamic antimicrobial chemotherapy in isolates of *Staphylococcus* spp. from oral cavities of patients with pulmonary tuberculosis undergoing antibiotic treatment. Twenty isolate species of *Staphylococcus* were used, including 6 of *S. epidermidis*, 5 of *S. aureus*, 5 of *S. schleiferi*, 2 of *S. capitis*, 1 of *S. haemolyticus* and 1 of *S. lentus*. Each isolate was submitted to 5 experimental conditions: association of laser and photosensitize methylene blue (L+F+), irradiation with laser alone (L+F-), and treatment with methylene blue alone (L-F+), treatment with physiological solution (L-F-) and treatment with ciprofloxacin. Following each treatment, the suspension was serially dilute in sterile physiological solution, plated in brain heart infusion agar and incubated at 37°C for 24 hours. The colonies were counted and the number of colony-forming units per mL (ufc/mL) was calculated. The results were analyzed statistically by variance test. The L+F+ group showed a significant reduction on the number of cfu/mL when compared to L-F- group for the 20 isolates studied. The perceptual variability of microbial reduction was 99,97 to 100%. The antibiotic therapy resulted in completed elimination of 19 isolates of *Staphylococcus*. The methylene blue alone also reduced the number of microorganisms. However, the use of irradiation alone didn't showed antimicrobial effect. It was concluded that, the photodynamic antimicrobial chemotherapy was effective on the reduction of all isolates of *Staphylococcus* studied.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Tuberculose.....	16
3.2 <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	21
4 MATERIAL E MÉTODO.....	28
4.1 Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	28
4.2 Preparo da suspensão de <i>Staphylococcus</i> spp.....	29
4.3 Fotossensibilizador.....	32
4.4 Antibiótico.....	32
4.5 Laser em baixa intensidade.....	33
4.6 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	34
4.7 Interpretação dos resultados e análise estatística.....	39
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	47
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

cm	centímetro
CO ₂	gás carbônico
F	fotossensibilizador
L	laser
µm	micrometro
mL	mililitro
mm	milímetro
mW	mili Watts
nm	nanometro
MB	azul de metileno
MIC	concentração inibitória mínima
N	número de amostra
O ₂	oxigênio molecular
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
PACT	Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana)
s	segundo
spp.	espécies
TBO	azul de orto -toluidina
UFC	unidades formadoras de colônias
WHO	World Health Organization

1. Introdução

O uso indiscriminado de antibióticos pode favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes. O tratamento prolongado ou inadequado com esses medicamentos pode levar a uma superinfecção, que resulta da alteração da microbiota residente e aumento de patógenos potencialmente prejudiciais ou oportunistas (WINKELHOF et al, 1996). A terapia antibiótica prolongada pode causar o desenvolvimento de superinfecções em diversos tecidos do organismo, inclusive na cavidade bucal (SLOTS et al., 1990, 1999; HELOVUO et al., 1993, MEISEL, KOCHER, 2005).

Esta superinfecção pode envolver microrganismos residentes ou exógenos, como, por exemplo, *Staphylococcus* spp. que tem sido descrito como organismos superinfectantes em periodontites. O uso de antibióticos, para doenças sistêmicas, tratamento de doenças periodontais e lesões bucais podem predispor o aumento do número de *Staphylococcus* spp. no periodonto e na cavidade bucal. Entre os estafilococos, a espécie coagulase-positiva *Staphylococcus aureus*, tem mostrado resistência à nova classe de antibióticos, inclusive a vancomicina, um antibiótico considerado a última linha de defesa (LOBERTO, 2002, JORI, 2006).

Atualmente, o desenvolvimento da terapia fotodinâmica tem possibilitado uma nova modalidade de tratamento para a redução ou eliminação de microrganismos, podendo substituir assim o tratamento com antibióticos (WILSON, DOBSON E SARKAR, 1993, WAINWRIGHT, 1998, DEMIDOVA, HAMBLIN, 2005).

A terapia fotodinâmica é estudada em várias modalidades terapêuticas da área médica, veterinária, odontológica, entre outras (PDT 2007). Tem sido aplicada na oncologia para o tratamento de tumores, tendo sido aprovada em diversos países embora o número total de indicações clínicas ainda seja limitado (JORI, 2006). A terapia fotodinâmica envolve o uso de radiação visível com comprimento de onda adequado para promover a lise, apoptose, destruição do DNA de células teciduais ou microbianas, previamente tratadas com

fotossensibilizador (HAYEK, et. al, 2005, DOBSON E WILSON, 1992, HAMBLIN et al, 1992, WAINWRIGHT, 1998).

A terminologia para cada aplicação diverge entre terapia fotodinâmica (PDT) e quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT). A PACT é uma técnica que se mostra efetiva *in vitro* contra bactérias, fungos e vírus (BURNS et al, 1995, WAINWRIGHT, 1998, MEISEL, & KOCHER, 2005).

A morte microbiana ocorre quando o corante absorve a energia do laser, levando a produção de substâncias altamente reativas, que causam danos aos microrganismos ou célula tecidual (WILSON et al, 1993).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos à terapia antibiótica prolongada para o tratamento da tuberculose pulmonar.

2. Proposição

A proposta do presente trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos à terapia antibiótica prolongada para o tratamento da tuberculose pulmonar.

3. Revisão da Literatura

3.1. Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica, causada por *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies patogênicas de micobactérias. A doença continua sendo importante problema de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos. A tuberculose é uma doença que afeta a humanidade desde os tempos antigos. Calcula-se a existência de 1,7 bilhões de pessoas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* no mundo, com cerca de 7,5 milhões de novos casos por ano, resultando em 2,8 milhões de mortes anuais (WHO, 2002).

Considera-se que são responsáveis pelo aumento da endemia tuberculosa no mundo as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o uso de drogas injetáveis, o aumento da pobreza, o aumento do número de desabrigados, a migração, má nutrição e a urbanização (NATAL, 1998).

O tratamento para tuberculose baseia-se na terapia com múltiplos agentes antimicrobianos por um período de 6 a 12 meses (WHO, 2003). São utilizados antibióticos específicos associados, como isoniazidas, etambutol e estreptomicina, para evitar a seleção de cepas resistentes. O tratamento com diferentes antimicrobianos é indicado porque os microrganismos da tuberculose podem sofrer seleção natural de microrganismos mais resistentes ou mutações utilizando-se um único antimicrobiano (BRASIL, 2002).

Este tratamento pode também levar a alterações da microbiota bucal residente, causando o crescimento de microrganismos potencialmente superinfectantes.

3.2. *Staphylococcus* spp.

A cavidade bucal humana é naturalmente habitada por inúmeros microrganismos. As características das bactérias permitem sua colonização nas superfícies dentárias, sulco gengival, língua e mucosa jugal, em harmonia com o hospedeiro, porém em algumas situações podem causar doença como cárie e doença periodontal (MOORE & MOORE, 1994).

O uso prolongado de antibióticos pode levar a uma superinfecção, inclusive na cavidade bucal (SLOTS et al, 1990; HELOVUO et al, 1993). Uma superinfecção, é na verdade, uma nova infecção, que dificulta o tratamento de um processo infeccioso já existente, alterando a microbiota comensal e causando o crescimento de microrganismos residentes potencialmente patogênicos ou patógenos oportunistas (WINKELHOF et al, 1996). Enterobactérias, estafilococos e leveduras são considerados microrganismos superinfectantes e podem ser encontrados na saliva, nas mucosas bucais, no biofilme supragengival e subgengival (RAMS et al., 1990, SLOTS et al., 1991).

As espécies de *Staphylococcus* não são consideradas residentes da microbiota bucal humana, entretanto podem atuar como patógenos oportunistas em indivíduos submetidos à medicação sistêmica prolongada de antimicrobianos e imunossupressores. Quando presentes encontram-se em número reduzido e são considerados como parte da microbiota transitória, porém com a administração sistêmica prolongada de antimicrobianos ou imunossupressores pode ocorrer um aumento desses microrganismos (WINKELHOFF, 1996, SLOTS et al., 1998, DAHLÉN & WIKSTRÖM, 1995). Estas infecções são denominadas oportunistas (KASTERSKY, 1985).

A presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal e bolsa periodontal de indivíduos diagnosticados com periodontite crônica foi avaliada por Loberto et al. (2004). A prevalência destes microrganismos foi de 61,36% na cavidade bucal e 37,5% em bolsa periodontal dos indivíduos estudados, sendo que 27,27% apresentaram o microrganismo em ambos os sítios. *S. epidermidis* foi à espécie mais prevalente tanto na cavidade bucal como na bolsa periodontal. Não foram

observadas diferenças estatisticamente significativas com relação à presença do microrganismo entre as faixas etárias, hábito de fumar e aumento da profundidade de sondagem.

Staphylococcus spp. têm sido recuperados de abscessos periodontais agudos em indivíduos imunocomprometidos e de infecções periodontais após terapia com antibiótico sistêmico. Um significativo aumento de *Staphylococcus* subgengival foi observado em indivíduos com periodontite submetidos à terapia com penicilina sistêmica, incluindo cepas resistentes ao antibiótico (HELOVUO et al., 1993).

Em uma pesquisa para avaliar a prevalência de enterobactérias, estafilococos e leveduras no biofilme gengival de indivíduos portadores de paralisia cerebral institucionalizados, Pannuti et al. (2001), relataram a presença destes microrganismos em 13,3 % dos indivíduos avaliados e sugeriram que esta presença foi transitória, não representando superinfecção.

Considera-se resistência antimicrobiana a capacidade de um microrganismo de crescer *in vitro* na presença da concentração que esta determinada substância atinge no sangue, embora a concentração sanguínea seja às vezes inferior àquela alcançada em líquidos como a bile e a urina, ou superior àquela alcançada após atravessar barreiras, como por exemplo, a barreira hemato-encefálica. A utilização de antibióticos pode permitir a seleção de microrganismos resistentes previamente existentes naquele sítio ou permitir a ocupação do espaço por microrganismos exógenos resistentes. A resistência pode ser natural ou adquirida. A resistência natural depende, ou da ausência da estrutura em que a substância atua ou da impermeabilidade da superfície celular a este fármaco. A resistência adquirida ocorre quando o microrganismo produz enzimas específicas, que inativa a droga ou quando não permitem sua absorção ou sua ligação ao seu alvo (TAVARES, 1996).

Um importante mecanismo de resistência bacteriana frente às penicilinas é a produção de β -lactamases. Dessa forma, a produção desta enzima por microrganismos na área subgengival resulta em falência da terapia com antibióticos β -lactamâmicos comumente utilizados e recorrência da doença.

Staphylococcus spp. produtores de β -lactamases foram detectados em indivíduos que apresentavam sítios com doença periodontal refratária (HANDAL et al. 2004).

Staphylococcus foram descritos a partir da análise de secreções purulentas de seres humanos por Robert Kock em 1878 e cultivados em meio líquido em 1880 por Pasteur. O nome foi dado pelo cirurgião Alexander Ogstron, em 1881, ele correlacionou a alta taxa de mortalidade em decorrência de septicemia após cirurgias hospitalares com a presença destes microrganismos.

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formam esporos, são geralmente imóveis e suas células costumam-se apresentar na forma esférica. As células esféricas medem aproximadamente 0,5 a 1,5 μ m de diâmetro, apresentam-se isoladas, aos pares ou mais, caracteristicamente com a disposição de cachos irregulares (UENO & JORGE, 2006).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* compreende 32 espécies, das quais 16 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas estando as principais espécies no Quadro 1 (MARSOU et al. 1999; KANDA, et al., 2001; KONEMAN et al., 2001).

Quadro 1 – Principais espécies de *Staphylococcus* de origem humana, correlacionadas com habitat e patogenicidade (Continua).

Espécie	Habitat	Patogenicidade
<i>S. aureus</i>	Pele, fossas nasais, axilas e vagina	Infecções oportunistas, abscessos, pneumonia, bacteremia, endocardite, meningite
<i>S. epidermidis</i>	Pele, fossa nasal	Endocardite, infecções em cateteres, peritonite, bacteremia, osteomielite, infecções de vias urinárias, mediastinite
<i>S. saprophyticus</i>	Pele	Infecções urinárias agudas, cistite
<i>S. haemolyticus</i>	Pele	Infecções em cateteres, infecções urinárias, endocardites

Quadro 1 – Principais espécies de *Staphylococcus* de origem humana, correlacionadas com habitat e patogenicidade (Conclusão).

<i>S. warneri</i>	Pele	Bacteremia relacionada com cateteres, endocardite, osteomielite, meningite
<i>S. hominis</i>	Pele	Bacteremia em pacientes com câncer
<i>S. lugdunensis</i>	Pele	Endocardite, celulite, peritonite, osteomielite, abscessos
<i>S. capitis</i>	Glândulas sebáceas do couro cabeludo e fronte	Endocardite
<i>S. schleiferi</i>	Pele	Empiema cerebral, bacteremia, infecções de feridas e de cateteres
<i>S. lentus</i>	Ovinos e caprinos	Tonsilites

Como foi observado no Quadro 1, deve-se dar devida atenção ao fato de que a patogenicidade dos *Staphylococcus* spp. está relacionada em alguns casos com bacteremia e endocardite.

A endocardite infecciosa é uma doença que acomete as valvas cardíacas, e pode ser acompanhada de complicações e morbidade e mortalidade alta. A patogênese da endocardite depende da ocorrência de bacteremia. A bacteremia pode ocorrer espontaneamente ou pode ser uma complicação de uma infecção local (FRANCO, MANSUR, SIQUEIRA, 2007).

A espécie mais comumente associada a doenças humanas é o *Staphylococcus aureus* reconhecidamente o mais virulento dentro do gênero. *Staphylococcus epidermidis*, também é um importante patógeno, sobretudo, para aqueles indivíduos portadores de próteses valvares (UENO & JORGE, 2006).

Staphylococcus aureus é o agente mais comum de infecções piogênicas no homem, causando grande variedade de infecções como furúnculos, síndrome da pele queimada, pneumonia, osteomielite, meningite, endocardite, amigdalite, intoxicações alimentares, pulpites e estomatites. A característica da doença estafilocócica é a supuração. Uma vez que os estafilococos virulentos se estabelecem nos tecidos mais profundos, sua multiplicação causa necrose e

eventual formação de abscesso. Atualmente, a maioria das cepas de *Staphylococcus* isoladas de pacientes hospitalizados é resistente à penicilina e a muitos outros antibióticos (UENO & JORGE, 2006).

As colônias em meio sólido, geralmente são lisas, brilhantes, circulares, e translúcidas. *S. aureus* e algumas outras espécies formam colônias amarelas, acinzentadas, ou laranja em função da grande quantidade de pigmentos carotenóides localizados na membrana celular. Crescem dentro de larga faixa de temperatura (10-45°C), com temperatura ótima em torno de 37°C (UENO & JORGE, 2006).

A ciprofloxacina é um potente antibiótico da classe das fluoroquinolonas, possui um amplo espectro de atividade. É eficaz para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Sua ação é bem demonstrada para microrganismos como os *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PANUTTI, 2001, SANTOS, 2001)

Loberto (2005) avaliou a suscetibilidade de *Staphylococcus* spp. aos seguintes antimicrobianos: penicilina, oxacilina, cefalotina, ampicilina/sulbactam, gentamicina, netilmicina, eritromicina, clindamicina, pefloxacina, ciprofloxacina, tetraciclina, cotrimoxazol, nitrofurantoína, rifampicina, vancomicina e teicoplanina. Observou-se que todas as cepas de *S. aureus* testadas e 85,71% de *S. epidermidis* foram resistentes a todos os antibióticos utilizados neste trabalho.

Assim, torna-se necessário à busca por novas terapias e alternativas de tratamento para as doenças causadas por espécies de *Staphylococcus*.

3.3. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Diversos trabalhos *in vitro* têm demonstrado que bactérias podem ser mortas por luz visível associada a um fotossensibilizador apropriado, caracterizando a terapia fotodinâmica (DOBSON & WILSON, 1992).

A terapia fotodinâmica apresenta diversos fatores a favor do tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos, incluindo um amplo espectro de ação, baixo potencial mutagenico, e falta de seleção de bactérias fotoresistentes. *Staphylococcus aureus* tem mostrado resistência à nova classe de

antibióticos, inclusive a vancomicina, um antibiótico considerado a última linha de defesa. A PACT resulta em atividade citotóxica em grande variedade de bactérias, fungos e protozoários patogênicos. A PACT é mais efetiva contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Os fotossensibilizadores em uma concentração micromolar podem reduzir $> 4-5$ log os microrganismos, utilizando intensidades em cerca de 50 mW/ cm^2 e tempos de irradiação menores que 15 min. (JORI, 2006).

Wainwright (1998), em uma revisão, se propôs a dar uma idéia sobre os fotossensibilizadores disponíveis para se utilizar contra organismos patogênicos, e as vantagens da PACT. A PACT é uma técnica efetiva *in vitro* contra bactérias, inclusive cepas resistentes a drogas, leveduras, vírus e parasitas. Uma das dificuldades, é que a técnica é limitada a infecções localizadas, pelo problema de entrega de luz. Com a resistência microbiana, a superinfecção é um problema para a microflora residente, e a terapia fotodinâmica antimicrobiana torna-se uma aliada contra os efeitos colaterais causados pela terapia antibiótica. Uma das vantagens da PDT e PACT, é a capacidade de excitar o fotossensibilizador, com o mínimo efeito sobre o tecido ao redor.

Encontram-se na literatura, diversos trabalhos em que se utiliza, para a aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana, compostos, fenotiazínicos como o azul de metileno, que é um composto aromático heterocíclico solúvel em água, com fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$ e massa molar 319.85 g/mol . O azul de metileno é usado como corante bacteriológico e como indicador, tem muitas aplicações nos mais variados campos como a biologia e da química, e se apresenta também efetivo na terapia fotodinâmica, devido ao seu comprimento de onda de absorção máxima igual a 660 nm , além de boa penetração no tecido alvo, com mínima toxicidade e ação antimicrobiana. O azul de metileno foi usado em identificação cirúrgica ressonantes em altas concentrações (1% w/v) sem causar toxicidade em humanos. Os corantes fenotiazínicos são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que bactérias Gram-negativas. (MIYAMOTO, 2007, WAINWRIGHT, 1998, MEISEL & KOCHER, 2005)

O azul de metileno é um fotossensibilizador catiônico e sua carga positiva promove uma ligação eletrostática na superfície externa da célula, causando um dano inicial a sua parede e induzindo uma maior atividade fotodinâmica contra as bactérias (Prates, 2007, JORI, 2006).

Usacheva et al. (2001), avaliaram a eficácia do azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TBO) contra diferentes bactérias com ou sem irradiação. Dentre seis microrganismos estudados, um foi o *Staphylococcus aureus*. A concentração do corante variou de 1 a 200 µm usando 0,45% de solução fisiológica como solvente. A irradiação foi no vermelho, com dois comprimentos de onda, 630 nm e 664 nm. O estudo demonstrou que ambos os corantes foram efetivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dentro dos parâmetros utilizados. Neste estudo o *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais resistente ao corante e laser, e o azul de metileno teve uma maior efetividade como fotossensibilizador sobre estas bactérias do que o azul de toluidina. Ambos os corantes, na ausência de luz, mostraram-se tóxicos contra os microrganismos, sendo que, o azul de toluidina mostrou uma maior toxicidade que o azul de metileno na ausência de luz.

Wilson et al. (1993), avaliaram, a terapia fotodinâmica em bactérias periodontopatogênicas, variando o fotossensibilizador e microrganismos. Um dos fotossensibilizadores foi o azul de melileno (25 µg/mL). Na ausência de luz, e nesta concentração não causou redução estatisticamente significativa em nenhuma das bactérias testadas (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), porém com a irradiação com laser de Helio Neônio, houve diferença significativa na redução de microrganismos. E a irradiação dos microrganismos na ausência do fotossensibilizador, também não mostrou diferença significativa na redução dos microrganismos.

O solvente utilizado para o fotossensibilizador (azul de metileno) pode ser importante para a fotoquímica do corante. Os solventes normalmente utilizados são, água deionizada, ou destilada, solução fisiológica (0,9% e 0,45%) e solução fisiológica tamponada com fosfato. Sendo assim, Nuñez et al. (2007), avaliaram a

função do solvente utilizado, concluindo que a redução microbiana foi significativamente maior quando a água deionizada foi utilizada como solvente.

O uso do azul de metileno, tem sua ação fotodinâmica principalmente gerando oxigênio singleto. O oxigênio molecular singleto é uma espécie excitada altamente reativa capaz de oxidar moléculas orgânicas com alta densidade eletrônica, como por exemplo, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Sua formação em meio biológico está associada a processos fisiológicos e patológicos. Como exemplos pode-se citar o seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra microrganismos (MIYAMOTO, 2007, WAINWRIGHT, 1998, HIOKA, 2007).

Quando o agente fotossensibilizador absorve os fótons da fonte de luz, seus elétrons passam ao estado excitado. Na presença do oxigênio, o corante, ao retornar ao estado fundamental, transfere sua energia ao substrato. Isto ocorre pela transferência de elétrons para o oxigênio levando a formação do radical superóxido, ou a abstração do hidrogênio de uma biomolécula, sendo o resultado final, um radical, com potencial para causar danos às áreas circunvizinhas. O estado tripleto do fotossensibilizador pode também transferir sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental. A molécula resultante será então o oxigênio singleto, que é um poderoso agente oxidante e altamente tóxico para células (MIYAMOTO, 2007, WAINWRIGHT, 1998).

Em outras palavras a terapia fotodinâmica inicia-se quando a molécula do fotossensibilizador absorve a luz que a irradia e sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, porém menos estável, chamado estado singleto. Posteriormente esta molécula volta para um nível de energia mais baixo ou para seu estado inicial. Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato de várias formas, por meio de fluorescência ou pode passar a um nível de energia intermediário, conhecido como estado tripleto, que está entre o estado fundamental e o estado singleto. Este decaimento energético pode excitar outros componentes do meio, interagindo bem com a molécula de oxigênio e gerando rapidamente formas tóxicas á célula, como peróxidos, radicais hidroxila, íons superóxidos e oxigênio singleto, este último sendo apontado como maior causador de dano celular (Prates, 2007).

Hayek et al. (2005) compararam os efeitos da terapia fotodinâmica com a terapia convencional (raspagem e irrigação com clorexidina a 0,12%) na redução microbiana em peri-implantites induzidas por ligadura em cães. Utilizaram um laser de diodo de GaAlAs (660 nm) , com uma potência de 49 mW, energia de 7,2 J por 3 minutos. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica é um método não invasivo, efetivo no tratamento de peri-implantites comparado com a elevação mucoperiostal para raspagem da superfície do implante. O uso do azuleno, como fotossensibilizador, mostrou-se efetivo contra os microrganismos peri-implantares e não comprometeu a superfície do implante e nem os tecidos ao redor.

Willian et al. (2002) avaliaram a ação da fotoativação do azul de ortotoluidina em *Streptococcus mutans*. Foi observado que o uso isolado do azul de toluidina O apresentou efeitos mínimos na redução dos microrganismos, porém a combinação do corante e luz reduziu um grande número de *S. mutans*. Em outro estudo, Burns et al. (1995) demonstraram que o azul de toluidina O e a fotoativação foram efetivos na redução de *S. mutans* sem danos aparentes a estrutura dentinária.

Wilson e Pratten (1995) utilizaram laser de diodo em baixa potência de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), com comprimento de onda de 660 nm, na presença de Ftalocianina Dissulfonada de Alumínio (AIPcS₂), como fotossensibilizador, em *Staphylococcus aureus*. Este estudo indicou a possibilidade do uso de fotossensibilização letal no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Entretanto, para evitar danos às células do hospedeiro deve-se utilizar uma concentração adequada do corante e dosimetria de luz apropriada.

Em revisão de literatura, Meisel e Kocher (2005) indicaram a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana para doenças periodontais, utilizando o azul de metileno, mostrando a possibilidade deste tratamento como coadjuvante da terapia básica convencional nos casos de furca, bolsas profundas, diminuição do risco de bacteremia e outras situações.

Dobson e Wilson (1992) utilizaram diversos corantes e laser de He/Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm e potência de 7.3 mW, em *Porphyromonas*

gingivalis, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os autores verificaram que a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana foi efetiva na redução microbiana, conseguindo sensibilizar espécies de bactérias presentes em biofilme periodontal, utilizando o azul de metileno e o azul de toluidina em uma concentração que não ultrapassava a 0,01%, podendo representar uma alternativa de tratamento das doenças periodontais inflamatórias, quando o uso de antibióticos e anti-sépticos é indicado. Wilson (1993) irradiando os mesmos microrganismos anteriormente citados, concluiu que o uso do laser sem o fotossensibilizador não causou efeito significativo. Porém o uso do azul de toluidina O ou azul de metileno em conjunto com o laser de He/Ne resultou em redução significativa do número destes microrganismos.

Nussbaum et al. (2002), estudaram o efeito da radiação laser em baixa intensidade com comprimento de onda de 810 nm (3 W) , nos modos contínuo e pulsado em diferentes doses no crescimento bacteriano, verificando as diferentes respostas de crescimento para diferentes espécies de bactérias. No modo contínuo observaram uma estimulação (20%) no crescimento de *P. aeruginosa* na dose de 1 J/cm² enquanto inibição em doses maiores que 5 J/cm² (25%). O mesmo laser mostrou não inibir o crescimento de bactérias do tipo *S. aureus*. Entretanto em outro trabalho, os mesmo autores (2003), observaram inibição do crescimento de *P. aeruginosa* e indiferença para *S. aureus*.

Deve-se levar em consideração a quantidade de energia a ser utilizada na PACT. A densidade de potência é normalmente dada em mW/ cm² . A dose descreve a energia recebida. O tempo é calculado em segundos. A densidade de potência, o tempo de iluminação, ou ambos, podem ser variados para dar a mesma dose. Uma alta densidade de potência, em um tempo menor pode, resultar em diferentes resultados em termos de morte microbiana. Geralmente a concentração do fotossensibilizador é de 10 µM a 3000 µM e o comprimento de onda varia entre 600 e 700 nm (MEISEL & KOCHER, 2005).

Williams et al. (2003), utilizaram como fotossensibilizador o azul de ortotoluidina (TBO). Foram adicionados em poços de placa de microtitulação, 30 µL de suspensão bacteriana e 30 µL de solução de TBO ou solução fisiológica estéril a

0,85%. As potencias variaram de 20 a 80 mW e o tempo de irradiação variaram entre 5 a 60s, produzindo energias entre 0.4 - 4.8 J. Na concentração utilizada o corante sozinho não apresentou efeito algum, o mesmo para o uso do laser sem o fotossensibilizador. A combinação da solução de azul de toluidina associada à irradiação foi altamente efetiva, matando um grande número de *S. mutans*.

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito fotodinâmico antimicrobiano sobre várias cepas de *Staphylococcus* isoladas de pacientes.

4. Material e Método

4.1 Cepas de *Staphylococcus*

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP (protocolo nº 07/2007-PH/CEP).

Foram utilizadas 20 cepas de *Staphylococcus*, sendo 5 de *S. aureus*, 6 de *S. epidermidis*, 5 de *S. schleiferi*, 2 de *S. capitis*, 1 de *S. haemolyticus* e 1 de *S. lentus*. Essas cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP. Todas as cepas foram isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos a antibióticoterapia prolongada por um período mínimo de 45 dias e máximo de 6 meses para o tratamento da tuberculose pulmonar (Querido, 2005). Duas cepas, uma de *S. aureus* e uma *S. schleiferi* foram coletadas da bolsa periodontal do mesmo paciente. E duas cepas, uma *S. aureus* e *S. epidermidis*, também foram coletadas do mesmo paciente, porém uma da cavidade bucal e outra de bolsa periodontal, respectivamente. As outras 16 cepas foram provenientes de diferentes pacientes.

Cada cepa foi submetida a diferentes condições experimentais conforme Quadro 2. Foram realizados 30 ensaios a partir de cada cepa de *Staphylococcus*, totalizando 600 ensaios.

Quadro 2 – Número de ensaios nos diferentes grupos experimentais para uma cepa de *Staphylococcus* a ser estudada.

Grupos experimentais	Número de ensaios
Laser + Azul de Metileno (L+F+)	6
Laser (L+F-)	6
Azul de metileno (L-F+)	6
Solução fisiológica (L-F-)	6
Antibiótico	6
Total	30

4.2 Preparo da suspensão de *Staphylococcus*

Foi preparada uma suspensão para cada cepa de *Staphylococcus* contendo 10^6 células viáveis/mL. Para o preparo da suspensão, a cepa foi semeada em ágar Manitol (Difco, Detroit, EUA) e incubada a 37°C por 24 horas (Figura 1).



Figura 1 – Crescimento de *Staphylococcus* após 24 hs em ágar manitol.

A seguir, esse microrganismo foi cultivado em caldo Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion Agar* - Difco, Detroit, EUA) por 18 horas a 37°C (Figura 2).

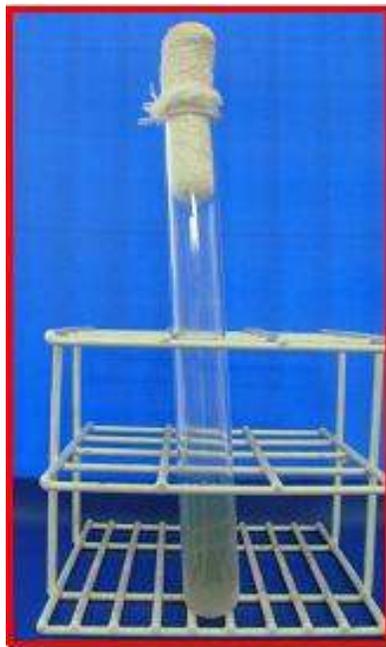


Figura 2 – Microrganismo em Caldo Infuso Cérebro-Coração

O meio em caldo foi centrifugado a 1300Xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante, e depois suspenso em 5mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%). Esse procedimento foi repetido e o sedimento novamente suspenso em 5mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) (Figura 3). A contagem do número de células viáveis da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 490nm (Figura 4).



Figura 3 - Centrifuga a 1300Xg durante 10 minutos



Figura 4 - Espectrofotômetro.

4.3 Fotossensibilizador

Para a sensibilização de *Staphylococcus* foi utilizado como fotossensibilizador o corante azul de metileno a 0,1%.

A solução de azul de metileno foi preparada pela dissolução do pó (Sigma, Germany) em solução fisiológica de NaCl (0,85%). Essa solução foi então, filtrada em membrana esterilizada com poros de diâmetro de 0,22 μ m (Figura 5).



Figura 5 – Esterilização da solução de Azul de Metileno por filtração

4.4 Antibiótico

O antibiótico utilizado foi Ciprofloxacina (Farmácia de manipulação Vivência, Pindamonhangaba, SP) na concentração de 1,6 mg/mL.

4.5 Laser em baixa intensidade

A fonte de luz usada foi um laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Figura 6) (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esses fotossensibilizadores, potência de 35 mW e energia de 10 J. A intensidade foi de 92 mW / cm² e a fluência igual a 26,3 J / cm².

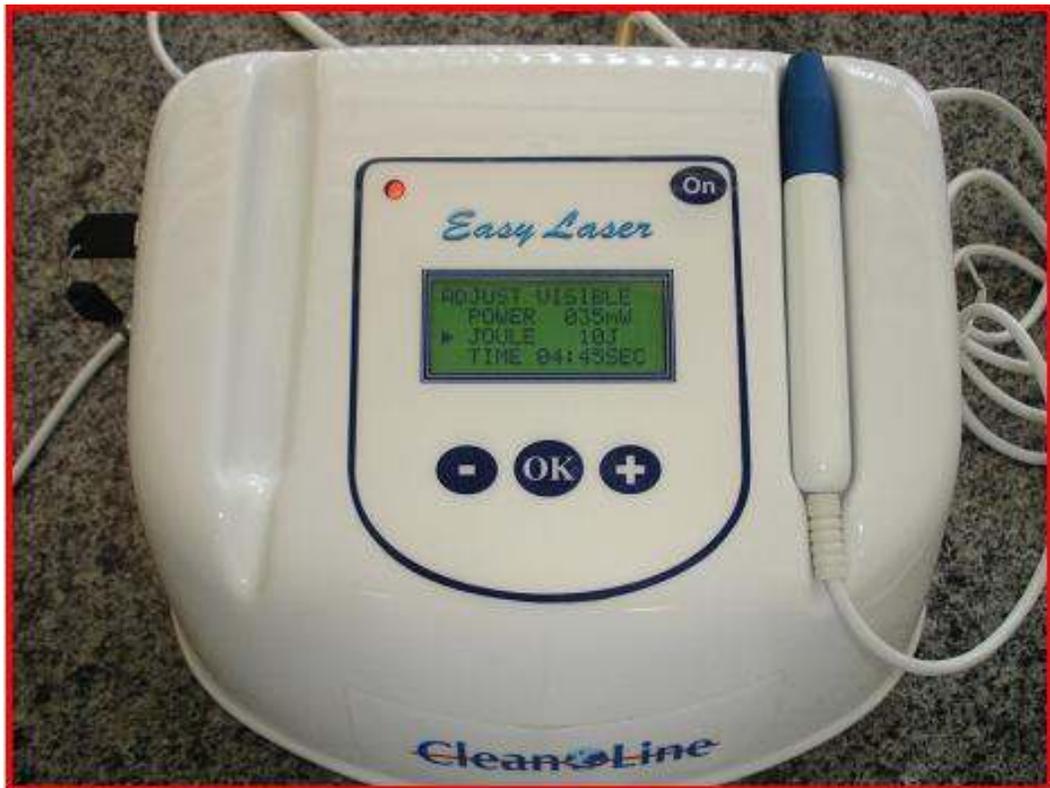


Figura 6- Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil

4.6 Fotossensibilização *in vitro*

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foram adicionados 0,1 mL de suspensão de *Staphylococcus* e 0,1 mL do fotossensibilizador (onde a concentração final após a adição da suspensão de *Staphylococcus* é de 0,05%) , da solução fisiológica ou do antibiótico (Figura 7). A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, SP)(Figura 8). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado de acordo com os grupos previamente descritos (Quadro 2). A irradiação das amostras (Figura 9) foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar (Figura 10).

Após a irradiação, foram realizadas diluições seriadas do puro a 10^{-4} e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Infuso Cérebro-Coração (Brain Heart Infusion Agar - Difco, Detroit, EUA) (Figuras 11, 12). Após incubação a 37° C por 24 horas (Figura 13), foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).



Figura 7 - Adição de 0,1 mL de suspensão de *Staphylococcus* e 0,1 mL do fotossensibilizador, da solução fisiológica ou do antibiótico.



Figura 8 - Agitador orbital



Figura 9 – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana – Irradiação da Suspensão de *Staphylococcus* Fotossensibilizados com Azul de Metileno.



Figura 10 - Câmara de fluxo laminar

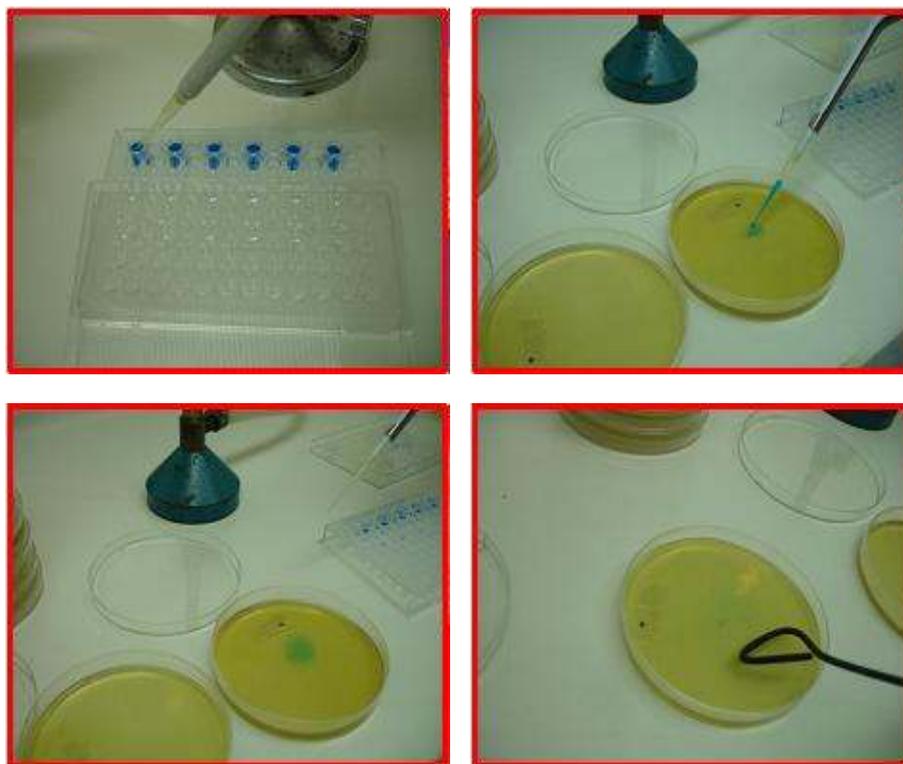


Figura 11- Aliquotas de 0,1 mL de cada ensaio puro após irradiação, semeadas em duplicata em placas contendo ágar Infuso Cérebro-Coração

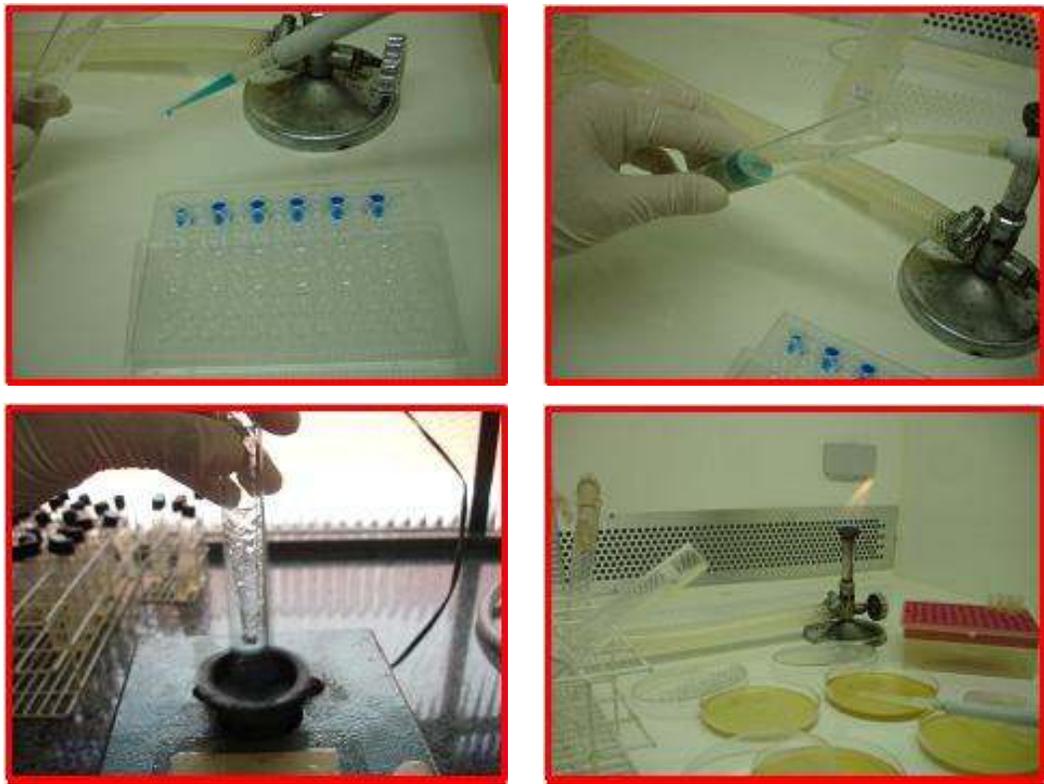


Figura 12- diluições seriadas de 10^{-2} e 10^{-4} e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Infuso Cérebro-Coração



Figura 13 – Incubação a 37° C por 24 horas

4.7 Interpretação dos resultados e análise estatística

Os dados de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (Figura 14) foram transformados em logaritmo e submetidos à análise estatística descritiva em Programa Minitab versão 14. A partir dos resultados das diferentes espécies de *Staphylococcus* testadas, foram feitos os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) e Tukey, considerando-se nível de significância de 5%.

Para cada cepa foi calculado o percentual de redução de UFC/mL para a terapia fotodinâmica considerando-se os grupos L+F+ e L-F-, e para o uso isolado do fotossensibilizador considerando-se os grupos L-F+ e L-F-.

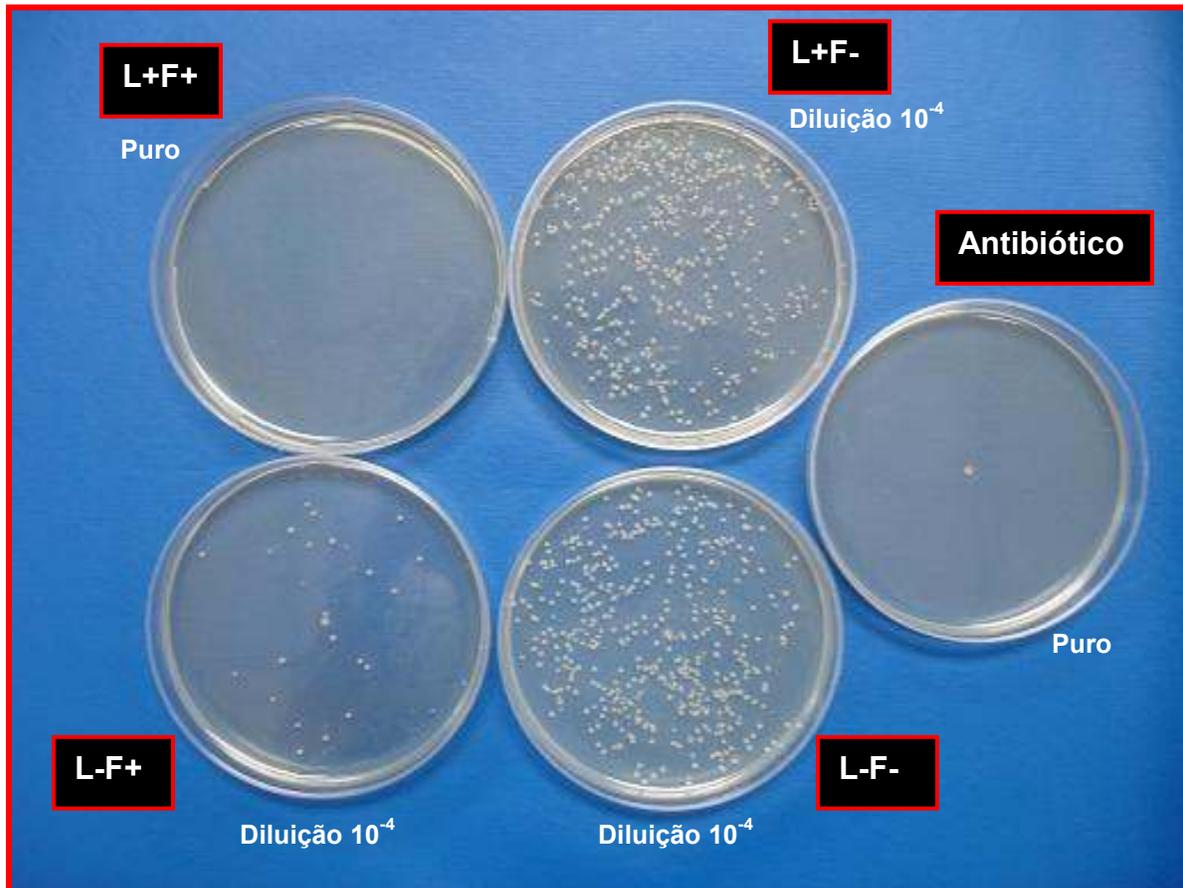


Figura 14 – Colônias de *Staphylococcus* após incubação por 24 horas.

5. Resultados

Os resultados de UFC/mL (Log) para os grupos L+F+, L+F-, L-F+, L-F- e Antibiótico obtidos em cada cepa estudada estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias de UFC/mL (Log) obtidas nos diferentes grupos experimentais e cepas de *Staphylococcus*

Cepa	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-	Antibiótico
<i>S. aureus</i>	0,00	7,06	6,68	6,87	0,00
<i>S. aureus</i>	0,48	7,15	6,59	7,23	0,00
<i>S. aureus</i>	0,00	7,86	6,05	7,79	0,00
<i>S. aureus</i>	1,17	7,73	5,62	7,51	0,00
<i>S. aureus</i>	4,32	7,77	7,62	7,92	0,00
<i>S. epidermidis</i>	1,80	7,45	6,92	7,14	0,00
<i>S. epidermidis</i>	0,00	7,98	6,22	7,99	0,00
<i>S. epidermidis</i>	0,00	7,33	5,35	7,23	0,00
<i>S. epidermidis</i>	0,00	7,68	5,07	7,71	0,00
<i>S. epidermidis</i>	1,23	7,66	7,50	7,77	0,00
<i>S. epidermidis</i>	2,15	7,10	6,91	7,09	0,00
<i>S. schleiferi</i>	0,00	7,64	7,48	7,29	0,00
<i>S. schleiferi</i>	1,32	7,59	6,90	7,62	7,34
<i>S. schleiferi</i>	0,00	7,47	6,23	7,42	0,00
<i>S. schleiferi</i>	0,00	7,51	5,91	7,35	0,00
<i>S. schleiferi</i>	1,75	7,75	5,09	7,51	0,00
<i>S. capitis</i>	0,00	7,73	6,53	7,69	0,00
<i>S. capitis</i>	1,41	7,47	4,82	6,51	0,00
<i>S. haemolyticus</i>	0,00	7,06	6,15	6,71	0,00
<i>S. lentus</i>	2,55	7,53	7,26	7,44	0,00

Observa-se na Tabela 1 que o grupo L+F+ apresentou redução significativa no número de UFC/mL em relação ao grupo L-F- para as 20 cepas de

Staphylococcus estudadas. Em 10 cepas houve inibição total do crescimento de *Staphylococcus* após a realização da terapia fotodinâmica. O uso do antibiótico resultou na eliminação completa de 19 cepas de *Staphylococcus*. Esses dados sugerem que a terapia fotodinâmica apresentou efeito antimicrobiano similar ao antibiótico utilizado para as cepas testadas no presente estudo. O grupo L+F+ também exibiu menor número de UFC/mL em relação aos grupos L+F- e L-F+. O grupo em que se aplicou o corante sem o laser (L-F+) apresentou para todas as cepas um número de UFC/mL menor que L-F-, sugerindo que o uso isolado do azul de metileno também teve efeito bactericida sobre *Staphylococcus*. Entretanto, o grupo L+F- exibiu aumento de UFC/mL em relação ao grupo L-F- para 10 das 20 cepas estudadas, porém este aumento não é estatisticamente significativo.

Os resultados da análise estatística para cada espécie de microrganismo estudada estão apresentados na Tabela 2 e Gráfico 1.

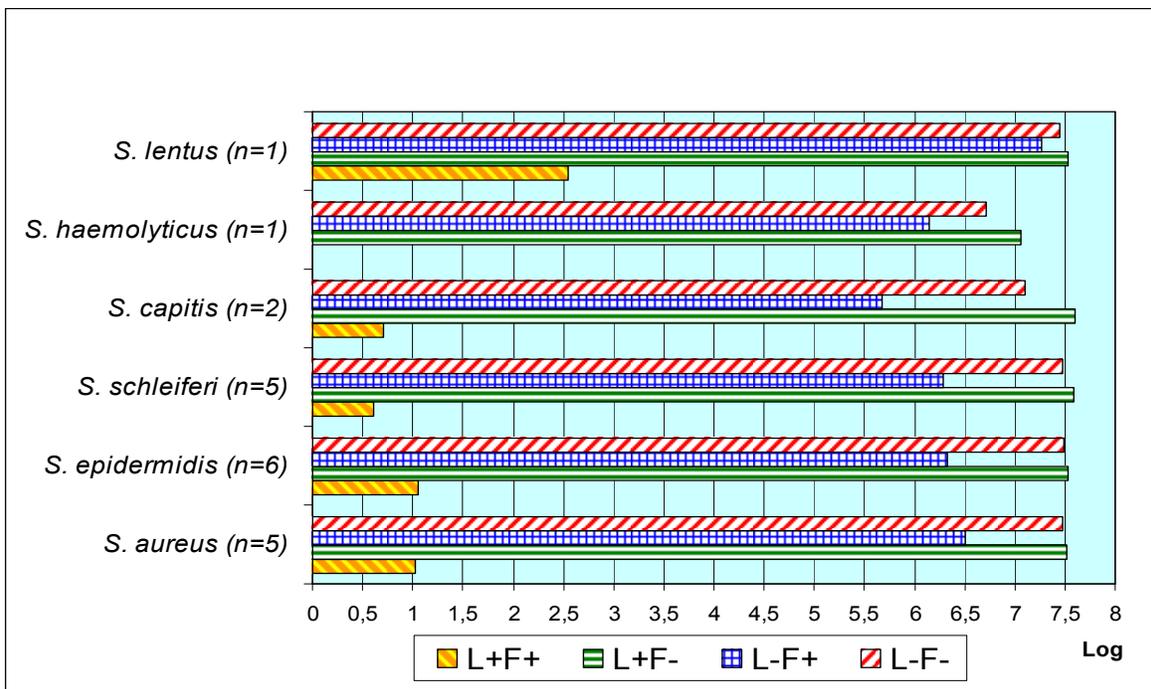
Tabela 2 - Médias de UFC/mL (Log) para as diferentes espécies estudadas

Espécies	L+F+	L+F-	L-F+	L-F-
<i>S. aureus</i> (n=5)	1,02 ^C	7,52 ^A	6,51 ^B	7,47 ^A
<i>S. epidermidis</i> (n=6)	1,05 ^C	7,53 ^A	6,33 ^B	7,49 ^A
<i>S. schleiferi</i> (n=5)	0,61 ^C	7,59 ^A	6,29 ^B	7,48 ^A
<i>S. capitis</i> (n=2)	0,70 ^C	7,60 ^A	5,67 ^B	7,10 ^A
<i>S. haemolyticus</i> (n=1)	0,00 ^C	7,06 ^A	6,15 ^B	6,71 ^A
<i>S. lentus</i> (n=1)	2,55 ^B	7,53 ^A	7,26 ^A	7,44 ^A

Teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Gráfico1 - Médias de UFC/mL (Log) para as diferentes espécies estudadas



O percentual de redução obtido pela terapia fotodinâmica em relação ao grupo L-F- estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Percentual de redução microbiana (UFC/mL) obtida com os grupos L+F+ comparando com o grupo L-F-

Cepas (n=20)	Percentual de Redução Microbiana L+F+ (%)
<i>S. aureus</i>	100
<i>S. aureus</i>	99,99
<i>S. aureus</i>	100
<i>S. aureus</i>	99,99
<i>S. aureus</i>	99,97
<i>S. epidermidis</i>	99,97
<i>S. epidermidis</i>	100
<i>S. epidermidis</i>	100
<i>S. epidermidis</i>	100
<i>S. epidermidis</i>	99,99
<i>S. epidermidis</i>	99,97
<i>S. schleiferi</i>	100
<i>S. schleiferi</i>	99,99
<i>S. schleiferi</i>	100
<i>S. schleiferi</i>	100
<i>S. schleiferi</i>	99,99
<i>S. capitis</i>	100
<i>S. capitis</i>	99,99
<i>S. lentus</i>	99,99
<i>S. haemolyticus</i>	100

6. Discussão

Os resultados obtidos com a terapia fotodinâmica antimicrobiana, com os grupos L+F+ em relação aos grupos L-F-, correspondem aos diversos trabalhos da literatura, onde as irradiações laser associadas a um fotossensibilizador apresentaram redução bacteriana. Jori (2006) relatou a resistência de *Staphylococcus aureus* a diversos antimicrobianos e a eficácia da quimioterapia fotodinâmica. Wainwright (1998), relatou que a PACT é uma técnica efetiva *in vitro* contra bactérias, inclusive cepas resistentes a fármacos. Em outro estudo, o de Garcez (2007), utilizando o corante azuleno e um equipamento laser de Arseneto de Gálio Alumínio (GaAIs), em uma potência de 10 mW, com uma intensidade aproximada de $9,6 \text{ W/ cm}^2$, e dose calculada de 1720 J/ cm^2 em *Enterococcus faecalis*, os autores apresentaram 100% de redução bacteriana em todas as amostras. Hayek et al. (2005), também usando o azuleno, e um laser de GaAIs, com uma potência de 40mW, energia igual a 7,2 Joules por três minutos sobre *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Staphylococcus* beta-hemolíticos, obtiveram redução destes microrganismos. Wilson et al. (1993), irradiando amostras de biofilme de placas subgengivais de pacientes com periodontite crônica expostas a uma potência de 7,3 mW por 30 segundos com um laser de Hélio /Neônio, na presença do fotossensibilizador azul de toluidina e azul de metileno obtiveram redução significativa destes microrganismos, sendo 91,1% para aeróbios, 96,6% para anaeróbios, 100% para bactérias pigmentadas, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, e 94,2% para *Streptococcus*.

Portanto, o resultado deste estudo, quanto à terapia fotodinâmica antimicrobiana, condiz com os diversos trabalhos encontrados na literatura como foi citado no início desta discussão, mostrando-se promissora esta alternativa de tratamento.

Em 50% das cepas, a terapia fotodinâmica antimicrobiana reduziu 100% dos microrganismos iguais ao uso do antibiótico, a ciprofloxacina.

Quanto a efetividade do fotossensibilizador, o azul de metileno, pode ser encontrado em outros trabalhos na literatura. Usacheva et al. (2001), avaliaram a eficácia do azul de metileno (MB) e azul de toluidina em seis microrganismos estudados. Dentre estes o *Staphylococcus aureus*. Os corantes foram efetivos contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais resistente ao corante e laser, e o azul de metileno teve uma maior efetividade como fotossensibilizador sobre estas bactérias do que o azul de toluidina. Também Hioka (2007), apresentou resultados de controle e morte de microrganismos através do sistema azul de metileno e LED. O azul de metileno apresenta alta absorção de luz na região do vermelho. A janela de emissão da fonte (aproximadamente 640 a 680 nm, com intensidade de $5\text{mW}/\text{cm}^2$) coincidia com a região mais intensa de absorção do azul de metileno. Após irradiação das amostras observou-se forte inibição, entre 79 e 84% de *S. aureus*. Yamada, et al. (2007), compararam a ação fotodinâmica antimicrobiana do azul de metileno, associada ou não a remoção mecânica de biofilme presentes em bolsas periodontais induzidas em ratos. O microrganismo utilizado para indução da doença foi *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os autores obtiveram uma redução de 93,5% no grupo remoção mecânica e PACT, frente a 87,7% no grupo onde foi realizada apenas a remoção de mecânica do biofilme. Marotti et al. (2007), apresentaram dois casos clínicos de herpes labial, onde utilizaram o corante azul de metileno e irradiação com laser de AsGaAl, 660 nm, com potência de 35 mW por 1 minuto (área de $0,03\text{ cm}^2$) e concluíram ser uma alternativa de tratamento eficaz.

Quanto à toxicidade do fotossensibilizador na ausência de irradiação, Wilson (1993), em um estudo com o azul de toluidina ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) sem a irradiação laser, encontrou redução significativa de *A. actinomycetemcomitans*. O azul de metileno, na concentração utilizada ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) não resultou em redução microbiana estatisticamente significativa, na ausência de radiação. Já Hioka (2007), utilizando o azul de metileno e LED na ausência da luz induziu certa inibição de *S. aureus*. Willian et al. (2002) avaliaram a ação da fotoativação do azul de orto-toluidina em *Streptococcus mutans*, e observaram que o uso isolado do azul de orto-toluidina

apresentou efeitos mínimos na redução dos microrganismos. Deve-se dar atenção a concentração do fotossensibilizador, porque a toxicidade do mesmo depende da concentração utilizada.

Quanto à aplicação da irradiação na ausência do fotossensibilizador, neste estudo não houve bioestimulação e nem redução de microrganismos. Wilson (1993) e Hioka (2007), não encontraram diferença significativa na redução dos microrganismos. Prates (2007), não encontrou diferença nos espécimes testados utilizando somente o laser em *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. Enquanto Nussbaum et al (2002), estudaram o efeito da radiação laser em baixa intensidade com comprimento de onda de 810 nm (3 W) , nos modos contínuo e pulsado em diferentes doses no crescimento bacteriano, verificando as diferentes respostas de crescimento para diferentes espécies de bactérias. No modo contínuo observaram uma estimulação (20%) no crescimento de *P. aeruginosa* na dose de 1J/cm² enquanto inibição em doses maiores que 5 J/cm² (25%). O mesmo laser mostrou não inibir o crescimento de *S. aureus*. Entretanto em outro trabalho, os mesmo autores (2003), observaram inibição do crescimento da *P. aeruginosa* e indiferença para *S. aureus*.

A terapia fotodinâmica mostrou-se eficaz na redução de todas as cepas de *Staphylococcus* estudadas, sugerindo-se estudos clínicos para viabilizar a utilização desta terapia como coadjuvante a terapias convencionais.

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, concluimos que:

- a) a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi eficaz na redução de todas às cepas de *Staphylococcus* estudadas;
- b) o uso isolado do azul de metileno apresentou efeito antimicrobiano às cepas de *Staphylococcus* estudadas;

8. Referências Bibliográficas

1. BURNS,T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of Dentine and Collagen on the Lethal Photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res** 1995;29:192-197.
2. BURNS,T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitization of Cariogenic Bacteria to Killing by Light from a Helium-Neon Laser. **J. Med Microbiol**, v.38, p.401-05,1993.
3. DAHLÉN,G.; WIKSTRÖM, M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and Candida in subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol**, v.10, n.1, p.42-6, Feb. 1995.
4. DEMIDOVA, T.N., HAMBLIN, M. R. Effect of Cell- Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, June, 2005, p. 2329-2335.
5. 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.
6. FRANCO, A.C.O., MANSUR, A.J., SIQUEIRA, J.T.T. Periodontia Médica: um Novo Paradigma para Cardiologistas e Cirurgiões-dentistas. In: SERRANO JR. C.V. et al. **Cardiologia e Odontologia, Uma Visão Integrada**. São Paulo: Ed. Santos 2007. Cap. 2. p.27-34.
7. GARCEZ, A.S, RIBEIRO, M.S., TEGOS, G.P., NÚÑES S.C., JORGE, A.O.C, HAMBLIM, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection. **Lasers in Surgery and Medicine**, Jan; 39(1):59-66 (2007).
8. GARCEZ, A.S., SOUZA, F.R, NÚÑES S.C., KARHER, J.M., RIBEIRO, M.S., Terapia Fotodinâmica em Odontologia – Laser de Baixa Potência para **Redução Microbiana**. **Revista da APCD**, v-57.n 3, Maio/Junho, 2003.
9. HAYEK, R.R.A, ARAÚJO N.S, GIOSO, M.A., FERREIRA, J., BATISTA-SOBRINHO, C.A., YAMADA Jr., A.M., RIBEIRO, M.S. Comparative Study Between the Effects of Photodynamic Therapy and Conventional Therapy

- on Microbial reduction in Ligature-Induced Peri-Implantitis in Dogs. **J Periodontol.** , August , p. 1275-1281, 2005.
10. HELOVUO, H.; HAKKARAINEN, K.; PAUNIO, K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol*, v.8, n.2, p.75-9, Apr. 1993
 11. HIOKA, N; GRUPO TFD-UEM, Terapia Fotodinâmica no combate a microorganismos, Palestra 09, p.20, Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, PDT 2007 . www2.if.usp.br/~pdt/4k.
 12. JORI, G., et al. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. **Lasers in Surgery and Medicine** 38:468-481 (2006).
 13. KALASTERSKY, J. Nosocomial infections due to Gram-negative bacilli in compromised hosts: considerations for prevention and therapy. **Rev Infect Dis**, v.7, suppl. 4, p. 552-8, Nov./Dec. 1985.
 14. KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. Trad. A.E. Cury. 5 ed. Rio de Janeiro: Médica e científica, 2001. 1465p.
 15. LOBERTO, J.C.S. et al. *Staphylococcus* spp. In oral Cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. **Braz J Microbiol**, v.35, p.64-8, 2004
 16. LOBERTO, J.C.S. et al. **Staphylococcus** spp. na cavidade bucal e na bolsa periodontal de indivíduos com periodontite crônica: presença e sensibilidade aos antibióticos. 2002. 97f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
 17. MAISCH, T., BOSL, C., SZEIMIES, R. M., LEHN, N., ABELS, C. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. April. 2005, p. 1542-1552.

18. MAROTTI, J.; ARANHA, A.C.C.; EDUARDO, C.P.; RIBEIRO, M.S. Tratamento do herpes labial pela Terapia Fotodinâmica –AP-15 Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, p. 238, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k.
19. MARSOU, R. et al. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. **Res Microbiol**, v.150, n.8, p.531-44, Oct. 1999.
20. MEDRADO, A.R.A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Laser in Surgery and Medicine** (2003) 32: 239-244
21. MEISEL, P., KOCHER, T. Photodynamic Therapy for Periodontal Diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology** 79 (2005) 159-170
22. MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G.E.; PRADO, F.; UEMI, M.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Hidroperóxidos biológicos e geração de oxigênio molecular singlete. Palestra 10, Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, p. 22, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k.
23. MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H.; The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol** 2000, v.5, p. 66-77, June 1994.
24. MURDOCH, F.E.; SAMMONS, R.L.; CHAPPLE, I.L.C. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. **Oral Dis**, v.10, n.3, p.155-62, Apr.2004
25. NATAL, S. A retomada da importância da tuberculose como prioridade para ações de saúde pública. **Bol Pneum Sanit**, v.6, n.2, p.40-1, jul./dez. (1998)
26. NÚÑES, S.C.; GARCEZ, A.S.; RIBEIRO, M.S. PDT antimicrobiana em Odontologia: Mecanismos e Aplicações – Palestra-07 Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, p. 17, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k
27. NÚÑES, S.C.; GARCEZ, A.S.; JUNQUEIRA, H.; BAPTISTA, M.S.; RIBEIRO, M.S. Avaliação da função do solvente na eficiência fotodinâmica

- antimicrobiana do azul de metileno. FS -31- Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, p. 17, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k
28. NUSSBAUM E.L., LILGE L., MAZZULI T. Effects of 810 nm laser irradiation on *in vitro* growth of bactéria: comparison of contínuos wave and frequency modulated light. **Lasers Surger Med**. 2002; 31 (5): 343-51
29. NUSSBAUM E.L., LILGE L., MAZZULI T. Effects of low-level laser theraphy (LLLT) of 810 nm upon *in vitro* growth of bacteria : relevance of irradiance and radiant exposure. **J. Clin. Laser Med. Surg.** 2003 Oct; 21 (5): 283-90.
30. PANUTTI, C.M. et al. Prevalencia de microorganismos superinfectantes na placa bacteriana supragengival de deficientes mentais institucionalizados. **Rev Pos Grad Fac Odontol Univ São Paulo**, v.8, n.1, p. 39-5, jan/mar. 2001.
31. PDT 2007. Terapia Fotodinâmica. Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos, e Aplicações na Área de Saúde. Disponível em: www2.if.usp.br/~pdt/4k . Acesso em: Junho de 2007.
32. PRATES, R.A., YAMADA JR., A.M., SUZUKI, L. C., HASHIMOTO, M.C.E., CAI, S., GOUW-SOARES, S., GOMES, L. RIBEIRO, M.S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 86 (2007) 70–76
33. RAMS, T.E.; BABALOLA, O.O.; SLOTS, J. Subgengival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.1, p.29-32, Feb.1990.
34. SANTOS, S.S.F. **Presença de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero Pseudomonas na cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica**. 2001. Tese apresentada a Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos para obtenção do grau de Doutor.
35. SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patientsd. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.6, p.305-8, Dec.1990.

36. SLOTS, J. et al. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. **J. Periodontol**, v.62, n.9, p.543-7, Sept. 1991.
37. SOUZA, M.V.N., ALMEIDA, M.V., SILVA, A.D., COURI, M.R.C. Ciprofloxacina uma importante fluorquinolona no combate do Antraz. **Rev. Bras. Farm.**, 85(1): 13-18, 2004. <http://www.abf.org.br/pdf/2004/13-18.pdf>
38. TAVARES, W. **Manual de antibióticos e Quimioterápicos antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo: Editora Ateneu, 1996. p.269-72, 307-12,381,408,416,444,453,700-1
39. UENO, M.; JORGE, A.O.C. Cocos Gram-Positivos. In: JORGE, A.O.C., **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos, 2006. Cap. 9. p. 65-84.
40. USACHEVA, M. N., TEICHERT, M. C., BIEL, M.A. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, 29:165-173 (2001).
41. VAN WINKELHOFF, A.J.; RAMS, T.E.; SLOTS, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. **Periodontol 2000**, v. 10, p.45-78, Feb. 1996.
42. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. (1998) 42, 13-28.
43. WILLIAMS, J.A., PEARSON, G.J., COLLES, M. J., WILSON, M. The effect of Variable Energy Input from a Novel Light Source on the Photoactivated Bactericidal Action of Toluidine Blue O on Streptococcus mutans. **Caries Res** 2003;37:190-193
44. WILSON et al. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl Bacteriol**, v.78, p. 569-74, 1995.
45. WILSON, M., DOBSON J., SARKAR S., Sensitization of Periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low- power laser. **Oral Microbiol Immunol** 1993: 8: 182-187. Munksgaard, 1993

46. WILSON, M., PRATTEN, J. Lethal Photosensitisation of *Staphylococcus aureus In Vitro*: Effect of Growth Phase, Serum and Pré-Irradiation Time. **Lasers in Surgery and Medicine** 16:272-276 (1995).
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO Report 2002. Geneva: WHO 2002. Disponível em <http://www.who.int/gtb/publications>.
48. YAMADA, JR, A.M., SUZUKI, L.C., PRATES, R.A., CAI, S.; RIBEIRO, M.S. Redução Microbiana em Periodontite após terapia fotodinâmica. Oral-1 Terapia Fotodinâmica, 03-06 de junho de 2007, RESUMOS, p. 29, PDT 2007. www2.if.usp.br/~pdt/4k.
49. ZECELL, D.M., MALDONADO, E.P., RIBEIRO, M.S. Interação da Luz Laser com Tecidos Biológicos: Aplicações. **Apostila do Mestrado profissionalizante Lasers em Odontologia**, Disciplina LO-03 Versão 2S/ 2005. p.103-107.