



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIANA YURI NAGATA

**ESTUDO DE DIFERENTES CORANTES PARA APLICAÇÃO EM INATIVAÇÃO  
FOTODINÂMICA NA ODONTOLOGIA**

MARINGÁ

2011

JULIANA YURI NAGATA

**ESTUDO DE DIFERENTES CORANTES PARA APLICAÇÃO EM INATIVAÇÃO  
FOTODINÂMICA NA ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mitsue Fujimaki Hayacibara

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Sano Suga Terada

MARINGÁ

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

N147 Nagata, Juliana Yuri  
Estudo de diferentes corantes para aplicação em  
inativação fotodinâmica na odontologia/ Juliana Yuri Nagata  
-- Maringá, 2011.  
101 f. : il, figs, tabs., fotos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mitsue Fujimaki Hayacibara.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Sano Suga Terada.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de  
Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Integrada.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Fotosensibilizador. 3.  
Oxigênio singlete. I. Hayacibara, Mitsue Fujimaki, orient.  
II. Terada, Raquel Sano Suga, Co-orientadora. III.  
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da  
Saúde, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.

616.31 CDD 21.ed.

JULIANA YURI NAGATA

**ESTUDO DE DIFERENTES CORANTES PARA APLICAÇÃO EM INATIVAÇÃO  
FOTODINÂMICA NA ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº Drº Pedro Luiz Rosalen

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

---

Profº Drº Wilker Caetano

Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Profª Drª Mitsue Fujimaki Hayacibara

Universidade Estadual de Maringá - UEM

# *Dedicatória*

*À Deus, por ser meu ponto de apoio  
em todos os momentos.*

*Aos meus pais, Hiromitsu e Clara, por me  
ensinarem que tudo é possível com  
honestidade, dedicação e amor.*

*Aos meus irmãos, Mitsuo e Emi, por  
me lembrarem todos os dias que em  
nossa família, nunca se está só.*

# *Agradecimentos*

*Agradeço acima de tudo a Deus, que esteve presente em todos os momentos da realização deste sonho, até mesmo nos momentos em que eu estive ausente.*

*À minha amada Família,*

*Ao meu pai Hiromitsu Nagata,*

*O apoio, a dedicação, os ensinamentos, e acima de tudo o amor sempre me fizeram sentir segurança mesmo nos momentos mais difíceis. Nunca me senti desamparada, sem rumo, sempre tive meu grande herói segurando minha mão nestes anos.*

*À minha mãe Clara Akie Enomoto Nagata,*

*Não sei se um dia conseguirei amar tanto alguém como sou amada e cuidada por você. Sinto um orgulho e prazer enormes de ser sua filha, quero muito ser parecida com você, pois minha admiração e amor são incondicionais. Da senhora recebi todo apoio e todos os ensinamentos para estar aqui, construindo esse sonho, pois se hoje estou aqui, parte da vitória é sua. Obrigada por todos os dias de dedicação, de colo, de preocupação e carinho.*

*Ao meu irmão Renato Mitsuo Nagata,*

*Só o amor que sentes é mais do que suficiente para sentir-me feliz e segura. Mas usas sua inteligência e brilhantismo para ir além, consegues transformar qualquer momento em divertimento e tens uma facilidade incrível para aprender e discutir assuntos que não dominas. Admiro muito sua inteligência e criatividade, gostaria de ter um pouco dessas suas qualidades.*

*À minha irmã Mariana Emi Nagata,*

*Por quem sustento um amor e carinho enormes. Sua presença ao meu lado não me permitiu sentir solidão, sempre me concedendo amor, apoio e momentos felizes. Deus me permitiu esse grande privilégio, ter uma irmã, amiga, e colega profissional em uma pessoa. Não dividiremos mais a mesma morada, mas sei que seguiremos os caminhos mais belos porque assim a convivência nos permitiu enxergar a vida.*

*Aos meus amigos,*

*À amiga de coração **Thais Aglaet Matos Miranda,***

*Acalenta o coração pensar que a vida pode nos presentear com pessoas tão queridas como você. Sempre pensei nas nossas diferenças como algo que nos unia, mas sinto que agora já temos várias coisas em comum, estamos levando um pouco da personalidade de cada uma para o resto da vida. Sua companhia, carinho e ensinamentos foram imprescindíveis. A distância física que vai nos separar jamais constituirá barreira para o amor e admiração que sinto.*

*Às amigas **Jocilene Cristina Evangelista Bagateli, Luana Medeiros de Souza e Fernanda Ferruzi Lima,***

*A distância não foi suficiente para nos afastar, sinto por vocês um grande carinho e companheirismo. Obrigada por tudo!*

*Às amigas **Christine Men Martins e Núbia Inocencya Pavesi Pini,***

*Minha roda de amigos nunca foi a mesma da minha irmã. Mas como poderia deixar de tê-las como amigas? Só de olhá-las já me faz sentir um grande carinho. Considero-as anjos da guarda que Deus me enviou, pois me guiam e apóiam tão fortemente que jamais me senti sozinha e desamparada. Meus momentos mais divertidos e felizes nestes anos devo a vocês!*

*À prima **Silvia Sayuri Nanami,***

*Tão jovem, mas tão madura. Sua vivacidade e seriedade aparentemente paradoxais se completam. Apesar de no momento estar distante, sua presença, apoio e amor contribuíram de forma inestimável para minha formação. Sempre enxergou em mim coisas tão sinceras e boas, assim como sei que encara a vida. Você é possuidora de uma das maiores qualidades humanas e agradeço por compartilhá-la comigo.*

*À cunhada **Nilvea Ramalho,***

*A convivência e presença me fizeram amá-la também. Agora entendo porque meu irmão a tem ao seu lado. Rendo-me à sua dedicação e maturidade, são admiráveis.*

*À minha turma do mestrado, **Thais Aglaet Matos Miranda, Jocilene Cristina Evangelista Bagateli, Ariane Ximenes Graciano, Graciela Cristina Cândido, Roberta Saboia, Lúvia Tolentino, Rachel D'Áurea Furquim, Marilene Pintinha e Guilherme Boselli,***

*Foi um prazer imenso crescer academicamente com vocês. Muita cumplicidade, aprendizado conjunto e amizades conquistadas resumem esses dois anos que convivemos. Levo todos no meu coração pois compõem parte importantíssima na minha trajetória de vida.*

*Aos amigos de trabalho,*

*À Ariane Ximenes Graciano e Paula Mayumi Nishita,*

*Respeito, dedicação, companheirismo, apoio e admiração não são qualidades de colegas de trabalho, por isso as considero minhas AMIGAS! Obrigada por cada dia que passamos juntas, hoje agradeço até os momentos mais difíceis que tivemos, pois serviram para nos fortalecer e criar cumplicidade. Desejo a vocês muito sucesso, porque apesar de certo com a competência que possuem, é o que desejo às pessoas que amo.*

*À Franciele Sato, Ana Cláudia Nogueira, Juliana Semensato, Diogo Pelloso, Adriana Passarella Gerola e Bruno Rabello,*

*É interessante como a vida acadêmica nos traz desafios a princípio intransponíveis, mas que se tornam totalmente possíveis quando pessoas como vocês estão presentes. As ciências exatas voltaram à minha vida como um desafio agradável de superar. Muito obrigada por tornar possíveis a minha formação, aprendizado e pesquisa.*

*Aos mestres,*

*À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mitsue Fujimaki Hayacibara,*

*Foi um privilégio ser conduzida por suas mãos. Muito obrigada pelos ensinamentos, e pela generosidade, uma generosidade que compartilha e revela conhecimento. Meu desejo para seguir em frente nessa caminhada tem seu incentivo como fonte de inspiração.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Raquel Sano Suga Terada,*

*Agradeço imensamente pelo auxílio, orientação, convivência e amizade a mim dedicados em todos os momentos necessários. Sua simpatia, conhecimento e orientação foram inigualáveis.*

*Aos professores Dr<sup>o</sup> Noboru Hioka, Dr<sup>a</sup> Elza Kimura e Dr<sup>o</sup> Mauro Luciano Baesso,*

*É inspirador notar como pessoas tão cheias de compromissos ainda conseguem ajudar, orientar e transmitir conhecimento com tamanha boa vontade. Desejo sinceramente um dia ter a dedicação e amor que têm pela docência e pela pesquisa. Muito obrigada pela orientação, acolhida e paciência!*



*Agradecimentos institucionais,*

*Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da sua chefe de departamento Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Marubayashi Hidalgo e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos, pela participação desta conceituada instituição no meu crescimento científico, profissional e pessoal.*

*A todos os professores do Departamento de Odontologia, pelos anos de ensinamentos e formação que me proporcionaram.*

*Aos funcionários do Departamento de Odontologia e do Laboratório de Análises clínicas do HURM.*

*À CAPES, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos Prof. Dr. Ana Raquel Benetti e Wilker Caetano, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I – INTRODUÇÃO GERAL .....	5
II – OBJETIVOS.....	8
III – CAPÍTULOS.....	9
CAPÍTULO 1.....	10
PHOTODYNAMIC INACTIVATION FOR DENTAL CARIES: EVALUATION OF THE EMPLOYED PHOTOSENSITIZERS AND LIGHT SOURCES PROPERTIES .....	10
CAPÍTULO 2.....	47
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTODINÂMICAS DA ERITROSINA ASSOCIADA À LUZ HALÓGENA DO FOTOPOLIMERIZADOR NA ODONTOLOGIA .....	47
IV – CONCLUSÕES .....	95
V - REFERÊNCIAS.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Antimicrobial effectiveness of PDI: (A) Photosensitizer capability of interacting and acting to the bacterial membrane; (B) Photosensitizer ability of penetration and action inside the cell and (C) Reactive singlet oxygen formation around the bacterial cell.

Figura 2. Estrutura química da eritrosina.

Figura 3. Espectro de absorção da eritrosina (solução aquosa,  $5,65 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ) ( $\lambda_{\text{máx}}= 526 \text{ nm}$ ).

Figura 4. Luz halógena (Fotopolimerizador) de Resina Composta (Kondortech®) ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ).

Figura 5. Espectro de emissão da luz halógena (Fotopolimerizador Kondortech®). ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ )

Figura 6. Dispositivo com seis LEDs verdes ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

Figura 7. Espectro de emissão do LED verde ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

Figura 8. Espectro de absorção do Ácido Úrico ( $\lambda_{\text{máx}}= 293 \text{ nm}$ ).

Figura 9. Espectrofotômetro adaptado para as leituras da eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador sob ventilação adicional.

Figura 10. Ciclos de registros de espectro da solução contendo eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador ao longo do tempo.

Figura 11. Espectrofotômetro utilizado para determinação indireta do rendimento quântico de oxigênio singlete, utilizando solução de eritrosina e sistema de LED verde.

Figura 12. Bloco de dentina com marcação de esmalte (face oclusal).

Figura 13. Representação da célula fotoacústica

Figura 14. Espectrômetro Fotoacústico

Figura 15. Aplicação de Eritrosina no lado oclusal (marcação com esmalte) antes e após período de 30 minutos.

Figura 16. Avaliação da potência que atravessa blocos de dentina em Power Meter.

Figura 17. Variação espectral das soluções de eritrosina (A)  $1,13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ; (B)  $2,82 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e (C)  $5,65 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na presença de AU ( $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em água, com a irradiação de luz halógena (fotopolimerizador iluminação fracionada,  $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ); as setas indicam a degradação durante a iluminação. Cinética de degradação do ácido úrico nas três concentrações (D); (E) e (F).

Figura 18. (A) Variação espectral da solução de eritrosina  $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  iluminada pelo LED verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ ).

Figura 18. Sinais fotoacústicos da penetração de eritrosina em dentina em diferentes espessuras, ilustrando penetração em  $852 \mu\text{m}$  (A);  $600 \mu\text{m}$  (B);  $600 \mu\text{m}$  (C);  $600 \mu\text{m}$  (D) e  $600 \mu\text{m}$  (E). Comportamento da penetração do corante relacionada à integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras com exponencial de primeira ordem (F); (G); (H); (I); (J) e (K).

Figura 19. Cinética de degradação do AU mostrando a queda na absorvância mesmo sem iluminação com fotopolimerizador.

Figura 20. Cinética de degradação do AU em 1 minuto para a solução de eritrosina iluminada pelo LED verde e pelo fotopolimerizador.

Figura 21. Cinética de degradação da eritrosina ( $2,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ).

Figura 22. Sinais Fotoacústicos nas faces oclusal e pulpar do bloco de dente sem corante.

Figura 23. Sinais fotoacústicos da penetração de eritrosina em dentina em diferentes espessuras, ilustrando penetração em 850  $\mu\text{m}$  (A); 600  $\mu\text{m}$  (B); 600  $\mu\text{m}$  (C); 600  $\mu\text{m}$  (D) e 600  $\mu\text{m}$  (E).

Figura 24. Comportamento da penetração do corante relacionada à integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras removidas com exponencial de primeira ordem (A) bloco de 1100  $\mu\text{m}$ ; (B) bloco de 1100  $\mu\text{m}$ ; (C) bloco de 600  $\mu\text{m}$ ; (D) bloco de 600  $\mu\text{m}$  e (E) bloco de 600  $\mu\text{m}$ .

Figura 25. Sobreposição dos espectros de absorção da eritrosina com o fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ) (A) e da eritrosina com o LED verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ ) (B).

## ÍNDICE DE TABELAS

Table 1. Studies about PDI and dental caries.

Table 2. Questions for the PDI articles analyses

Table 3. Logarithm partition (Log P) of some photosensitizers (\*).

Table 4. Three main groups of PDT light sources and their characteristics (\*).

Table 5. Maximum absorption and concentration of photosensitizer solution on the monomeric and aggregated forms.

Tabela 6. Eficiência de formação de  $^1\text{O}_2$  ( $Y_{\Delta}$ ), calculada a partir dos valores das constantes de velocidade da primeira etapa de degradação do AU ( $k_1$ ) e da quantidade de fótons absorvidos em um intervalo de tempo ( $N_{Abs}$ ).

Tabela 7. Eficiência de formação de  $^1\text{O}_2$ , rendimento quântico da literatura e calculado, utilizando Rosa Bengala como padrão.

Tabela 8. Porcentagem de degradação de AU (proporcional à formação de  $^1\text{O}_2$ ) em um minuto da solução de eritrosina ( $5,65 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ) e pelo LED verde ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

Tabela 9. Constantes de velocidade de fotobranqueamento da eritrosina  $2,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , sob aeração constante, na presença e ausência de AU iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ).

Tabela 10. Potência de luz captada pelo Power Meter que atravessou as diferentes espessuras de dentina.

## Resumo

A Inativação Fotodinâmica (PDI) é um tratamento que utiliza um corante não tóxico (fotossensibilizador) e uma fonte de luz adequada, que na presença de oxigênio, associam-se para produzir agentes citotóxicos. Este trabalho teve como objetivos: (1) discutir as propriedades dos fotossensibilizadores e fontes de luz empregados em estudos de Inativação Fotodinâmica (PDI) para os microrganismos da cárie dentária; (2) quantificar a produção de oxigênio singlete da eritrosina associada a uma lâmpada halógena (fotopolimerizador); (3) avaliar *in vitro* a profundidade de penetração da eritrosina em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica e, (4) avaliar *in vitro* a profundidade de penetração de luz halógena em dentina. A discussão das propriedades baseou-se na elaboração de um artigo de revisão que selecionou estudos sobre PDI para microrganismos da cárie com a utilização de palavras-chave específicas. A produção de oxigênio singlete foi avaliada pelo teste do ácido úrico em solução aquosa; a penetração do corante, com a utilização de blocos de dentina pela técnica Espectroscopia Fotoacústica e a penetração da luz, com o emprego de um potenciômetro em blocos de dentina. A partir da revisão de literatura, observou-se que alguns fotossensibilizadores podem agir melhor contra bactérias Gram positivas ou negativas; que a máxima absorvância do corante deveria ser alcançada pela fonte de luz, e que alguns fotossensibilizadores podem ter sua absorvância modificada de acordo com a concentração empregada. Com relação à produção de oxigênio singlete, a solução de eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador de resinas compostas produziu oxigênio singlete, com 24,17% de degradação de ácido úrico em um minuto, e rendimento quântico de 0,82. A eritrosina apresentou profundidade de penetração em dentina entre 600 e 850  $\mu\text{m}$ ,

com 5% da quantidade total do corante em 283  $\mu\text{m}$  de espessura. E com relação à penetração do fotopolimerizador, sua luz mostrou potência transmitida pela amostra em até 2,5 mm de espessura de dentina. Dessa forma, observou-se que a associação eritrosina e fotopolimerizador apresentaram resultados fotodinâmicos promissores, mostrando-se como uma associação vantajosa para o uso na prática clínica.

**Palavras chave:** Terapia Fotodinâmica; fotossensibilizador; oxigênio singlete



## Abstract

Photodynamic Inactivation (PDI) is a treatment that utilizes a non toxic dye (photosensitizer) and an appropriate light source, which in the oxygen presence, generates toxic agents. This study has the aims of: (1) discussing commonly used photosensitizers and the properties of light sources in PDI studies for dental caries; (2) quantifying the production of singlet oxygen from the association between erythrosin and a halogen lamp (photopolymerizer); (3) evaluating *in vitro* the penetration depth of erythrosin in dentin through the Photoacoustic Spectroscopy technique and, (4) evaluating *in vitro* the penetration depth of halogen light in dentin. The properties' discussion based on the elaboration of a review article with selection of studies about PDI against microorganisms using specific key-words. A discussão das propriedades baseou-se na elaboração de um artigo de revisão que selecionou estudos sobre PDI para microrganismos da cárie com a utilização de palavras-chave específicas. The oxygen singlet production was assessed by the uric acid test in aqueous solution; the photosensitizer penetration, with the use of dentin blocks by the Photoacoustic Spectroscopy technique, and the light penetration, with the use of a power meter in dentinal blocks. Regarding the review of literature article, it was observed that some photosensitizers may be more effective against Gram positive or Gram negative bacteria; that maximum absorbance of the dye should be achieved for the light source used and that some photosensitizers may have their absorbance modified according to their concentration. Regarding the singlet oxygen production, erythrosin solution irradiated by resin composite photopolymerizer generated singlet oxygen with 24,17% of uric acid degradation in one minute, and quantum yield of

0,82. Erythrosin presented depth penetration in dentin between 600 and 850  $\mu\text{m}$ , with 5% of the whole quantity of the photosensitizer in 283  $\mu\text{m}$  of depth. Concerning the photopolymerizer penetration, the light showed transmitted potency from the sample up to 2,5 mm of dentin. Thus, it was observed that the association between erythrosin and photopolymerizer presented promising photodynamic results, and demonstrated being a useful association for clinical practice.

**Key words:** Photodynamic therapy; photosensitizer; singlet oxygen

## I - INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) refere-se a um tratamento que envolve a utilização de corantes (fotossensibilizadores) que são ativados pela luz. A absorção desta luz pelo fotossensibilizador inicia reações fotoquímicas que geram produtos citotóxicos os quais resultam nos efeitos terapêuticos desejados (Wilson e Patterson, 2008). Por meio da irradiação com luz de comprimento de onda adequado, o fotossensibilizador passa de um estado de baixa energia para um estado triplete de maior energia. O estado triplete do fotossensibilizador pode reagir diretamente com biomoléculas para produzir radicais livres e/ou íons radicais (reação do tipo I), ou reagir com moléculas de oxigênio para produzir oxigênio singlete altamente reativo (reação do tipo II) (Maisch, 2007). A TFD tem utilização aprovada para o tratamento clínico nos Estados Unidos, nos países da União Européia, no Canadá, Rússia e Japão (Allison et al., 2004), com aplicação principalmente no tratamento da degeneração macular (Wormald et al., 2007), do alívio de alguns sintomas do câncer de esôfago e de pulmão e para o tratamento das lesões pré-cancerígenas em pacientes com esôfago de *Barret* (Dolmans et al., 2003). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que esta terapia também apresenta atividade antimicrobiana (Wainwright, 1998; Hamblin e Hasan, 2004; Meisel e Kocher, 2005; O'Riordan et al., 2005; Kömerik and MacRobert, 2006; Wood et al., 2006; Donnelly et al., 2007), em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (PDI) (Gad et al., 2004).

A PDI contemporânea teve início há mais de cem anos, quando Oscar Raab publicou o primeiro artigo sobre os efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (eosina e alaranjado de acridina) contra microrganismos (Perussi, 2007). Observou, acidentalmente, que um meio de cultura contendo baixas concentrações desses

corantes, quando expostos a uma luz intensa proveniente dos raios de uma tempestade, provocava a morte do paramécio (protozoário causador da malária) que estava sendo cultivado (Perussi, 2007). Mais tarde, Von Tappeiner e Albert Jesionek (1903) relataram que esses efeitos tóxicos não se deviam apenas à presença da luz e realizaram o tratamento de carcinomas de células basais com a aplicação de solução de eosina, por via tópica, e posterior exposição à luz branca ou à luz solar (Perussi, 2007). Dessa forma, criou-se o termo “Reação Fotodinâmica” para todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotossensibilizador que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de células (Maisch, 2007).

Depois disso, as pesquisas com aplicabilidade dessa técnica contra microrganismos foram abandonadas por um tempo devido à efetividade das sulfonamidas e das penicilinas antes da Segunda Guerra Mundial (Maisch, 2007; Perussi, 2007). O retorno da aplicação antimicrobiana dessa técnica é resultado do enorme crescimento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes aos fármacos e da popularização da utilização do LASER (Perussi, 2007).

Entre as vantagens da TFD em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, observa-se que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos (Zanin et al., 2003). Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável (Zanin et al., 2003). Finalmente, o uso do fotossensibilizador ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica

(Wilson, 2004). Muitos autores têm relatado a ação antimicrobiana desta terapia sobre bactérias cariogênicas com o uso de fotossensibilizadores como azul de metileno e azul de orto-toluidina com diversas fontes de luz como LED e LASER (Dobson & Wilson, 1992; Burns et al., 1995; Zanin, 2002; Williams et al., 2003; Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006; Müller et al., 2007; Bevilacqua et al., 2007; Giusti et al., 2008; Baptista, 2009; Lima et al., 2009; Araújo et al., 2009). Diante da variedade de estudos testando diversos protocolos de utilização dessa terapia, poucos estudos analisaram as propriedades dos corantes e das fontes de luz utilizados em estudos da PDI para obtenção da melhor dose-resposta para a cárie dentária. Além disso, existem materiais da rotina odontológica que poderiam ser testados como coadjuvantes na PDI como evidenciadores de biofilme dental, incluindo a eritrosina (Wood et al., 2006; Metcalf et al., 2006), e a fonte de luz utilizada para a polimerização de resina composta, a lâmpada halógena (Paulino et al., 2005; Maisch et al., 2009; Bolean et al., 2010). Entretanto, nenhum trabalho até o momento avaliou a eficácia da combinação desses materiais, com relação à produção de oxigênio singlete, nem avaliou a profundidade de penetração em dentina, considerando a possível ação antimicrobiana dessa terapia em tecido dentinário cariado.

## II – OBJETIVOS:

1. Discutir as propriedades dos fotossensibilizadores e fontes de luz empregados em estudos de Inativação Fotodinâmica para os microrganismos da cárie dentária.
2. Quantificar a produção de oxigênio singlete da eritrosina associada a uma lâmpada halógena (fotopolimerizador).
3. Avaliar *in vitro* a profundidade de penetração em dentina do fotossensibilizador eritrosina.
4. Avaliar *in vitro* a profundidade de penetração em dentina da luz halógena (fotopolimerizador).

### **III – CAPÍTULOS**

Este trabalho é composto de dois capítulos:

- Capítulo 1: Revisão de literatura

“Photodynamic therapy for dental caries: evaluation of photosensitizers and properties of light sources”.

- Capítulo 2: Dados experimentais

“Avaliação das propriedades fotodinâmicas da eritrosina associada à luz halógena do fotopolimerizador na Odontologia”

## CAPÍTULO 1

### **Photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the employed photosensitizers and light sources properties\***

Juliana Yuri Nagata<sup>1</sup>

Noboru Hioka<sup>2</sup>

Elza Kimura<sup>3</sup>

Vagner Roberto Batistela<sup>4</sup>

Raquel Sano Suga Terada<sup>5</sup>

Ariane Ximenes Graciano<sup>6</sup>

Mauro Luciano Baesso<sup>7</sup>

Mitsue Fujimaki Hayacibara<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Master degree student from Dentistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Adjunct Professor of Chemistry, Chemistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>3</sup> Adjunct Professor of Pharmacy, Pharmacy and Pharmacology Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>4</sup> Temporary Professor of Chemistry, Chemistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>5</sup> Adjunct Professor of Dentistic, Dentistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>6</sup> Master degree student from Dentistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>7</sup> Professor of Physics, Physics Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>8</sup> Adjunct Professor of Public Health, Dentistry Department, Maringá State University, Maringá, Paraná, Brazil.



\* European Journal of Oral Science

**Running Title:** Photodynamic therapy for dental caries

**Address:**

Juliana Yuri Nagata

670 Irmã Eleotéria Street, 86800-300, Apucarana, Paraná, Brazil

Telefax: +55-43-34225996

E-mail: ju\_nagat@hotmail.com

Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RSS, Graciano AX, Baesso ML, Hayacibara MF

## **Photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the employed photosensitizers and light sources properties**

**Journal Title:** Eur J Oral Sci

### **Abstract**

Photodynamic therapy studies have shown promising results in inactivation of microorganisms related to dental caries. Large number of studies shows a variety of protocols for Photodynamic Inactivation (PDI) use and few studies analyzed photosensitizers and light sources properties in order to obtain the best dose-response of PDI for dental caries. This study aims to discuss the photosensitizers and light sources properties employed in PDI studies for dental caries. Three questions were formulated to discuss these aspects. The first involves the discussion of photosensitizers' properties and their performance with Gram positive and negative bacteria. The second discusses the use of light sources in accordance with the maximum absorbance of dye to obtain optimal results. And the third, the relevance of photosensitizer concentration and effectiveness of light sources, with possible formation of photosensitizer self-aggregates. This review demonstrated that some groups of photosensitizers may be more effective against Gram positive or negative bacteria; that dyes' maximum absorbance should be achieved by the light source, and that some photosensitizers may have their absorbance modified

according to the concentration due to the aggregation process in aqueous solution. For best results of cariogenic bacteria PDI, structural properties of bacteria membrane, photosensitizer concentration, solubility and polarity, and type of light source should be considered.

**Key-words:** Photodynamic therapy; dental caries; photosensitizer

**Address:**

Juliana Yuri Nagata

670 Irmã Eleotéria Street, 86800-300, Apucarana, Paraná, Brazil

Telefax: +55-43-34225996

E-mail: ju\_nagat@hotmail.com

## Introduction

Dental caries is one of the most prevalent chronic diseases of worldwide population, since it affects 60-90% of school-aged children and almost 100% of adult population (1). The prevalence of dental caries has been studied in many developed countries in recent years. In the USA, caries was considered the most common chronic disease of childhood, being five times more common than asthma (1), with a prevalence of 27% in the preschoolers, 42% in the school-aged children, and 91% of dentate adults (2). In Aboriginal children in Western Australia, dental caries is the fifth and sixth most common disease causing hospitalization in preschool children (aged 1–4 years) and primary school children (aged 5–12 years), respectively (3).

Dental caries results from interactions over time between specific pathogenic bacteria, primarily *Streptococcus mutans*, which metabolize ingested carbohydrates to form acids (4, 5). In recent decades, Photodynamic Therapy (PDT) has been studied as an alternative way of acting against the etiological factors of dental caries. PDT is a treatment that utilizes light to activate a photosensitizing agent in the presence of oxygen, resulting in the production of reactive radicals capable of inducing cell death (6).

In the literature, there is a large number of studies showing a variety of protocols for the use of PDT, but only few of them analyzed the properties of the photosensitizers and light sources used in Dentistry in order to obtain the best dose-response of Photodynamic Inactivation (PDI) for dental caries. There are two possible mechanisms involved in PDI: Type I pathway involves electron-transfer reactions from the excited Photosensitizer (PS) with the participation of a biological

substrate to produce free radicals that can then react with oxygen to produce cytotoxic species, such as superoxide, hydroxyl and lipid-derived radicals (7); Type II pathway involves energy transfer from the PS triplet state to ground state molecular oxygen to produce singlet oxygen, which can oxidize many biological molecules, such as proteins, nucleic acids and lipids, and lead to cytotoxicity (7).

This therapy has the advantage over others of dual selectivity: not only is the PS targeted to the tumor or other lesion cells, but the light can also be accurately delivered to the affected tissue (8). Currently, PDT has been applied mostly in the treatment of macular degeneration, pathological myopia, esophagus, lung and skin cancer and for the treatment of precancerous lesions in Barrett esophagus patients (9). Additionally, several studies have shown that PDT also has antimicrobial properties, in a process called "Photodynamic Inactivation" (PDI) (10, 8, 11- 15). These antimicrobial properties have been extended and studied for the treatment of caries (16- 24).

Several groups of photosensitizers, in different illuminations systems have been proposed. Even when the same PS and light source were employed, the diversity of irradiation protocols and variation of the concentration of PS, irradiation time, and light potencies result in difficulties to compare results. Few studies discussed the structural properties of both PS and light to specifically achieve the optimal protocol of this therapy against dental caries. Therefore, this study aims to discuss the properties of photosensitizers and light sources employed in PDI studies for dental caries.

## **Photodynamic Inactivation for dental caries**

The key-words Photodynamic Therapy; *Streptococcus mutans* and Dental caries were employed on Medline, Bireme and Scielo databases resulting in 18 articles related to PDI and dental caries (Table 1). These studies involved *in vitro* and *in situ* experiments published between 1992 and 2010, with a variety of PDI protocols.

Even studies that used the same photosensitizer or light source, variations can be noted. Based on these variations, three questions were formulated in order to discuss the use of different types of photosensitizers, in different concentrations, and the influence of the light sources on the results of these PDI researches (Table 2).

### **1) Which photosensitizers are more effective against specific groups of dental caries bacteria?**

The main organisms recognized to be associated with early caries development are streptococci mutans group (particularly, *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus*) and lactobacilli species (33, 34). As the lesion progresses to deeper dentin, anaerobic species start to thrive and a transition takes place from predominantly facultative Gram positive bacteria to strictly anaerobic Gram positive rods and cocci, and Gram negative rods (35- 37). If caries lesions are not treated, bacteria invade the pulp of the tooth through dentinal tubules, and may get access to the alveolar bone through the root canals of the teeth (13). Commonly isolated bacteria from the deep caries lesions, infected pulp, and root canal include Gram positive rods (such as *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Arachnia*, *Bifidobacterium* and

*Actinomyces*); Gram negative rods (such as *Prevotella intermedius*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Fusobacterium*); and Gram positive cocci (such as *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* and *Streptococcus*) (35- 39). Similar bacterial populations are found in periapical infection and abscesses (13, 40). In the analyzed articles, *Strep. mutans* was the most studied bacteria, since it is the main specimen related to dental caries. Moreover, other specimens were also evaluated by these authors, such as *Lactob. acidophilus*, *Strep. sobrinus*, *Strep. sanguinis*, and *Actinom. naeslundii*.

The effectiveness of PDI depends mainly on three main aspects: a) photosensitizer capability of interacting and acting to the bacterial membrane; b) photosensitizer ability of penetration and action inside the cell and c) reactive singlet oxygen formation around the bacterial cell (Figure 1).

The mechanism of binding to the cell membrane is different in Gram positive and Gram negative bacteria. These differences may be explained by structural varieties in their cell walls, and hydrophobic and charge effects of the photosensitizers. Gram negative bacteria present a complex outer membrane including two lipid bilayers that work as a physical and functional barrier between the cell and its environment, while Gram positive cells have a thick membrane that is relatively permeable (41). It is possible that this relatively porous layer of peptidoglycan and lipoteichoic acid outside the cytoplasmic membrane of Gram positive species allows the photosensitizer to diffuse into sensitive sites (6). In general Gram negative species are significantly resistant to some commonly used photosensitizers in PDI (41). In this review of literature, all the papers evaluated PDT against Gram positive species (which are more susceptible with no protective external membrane) and obtained effective results.

Besides these structural differences, photosensitizer charge may influence the inactivation of Gram positive or Gram negative specimens. In general, it is assumed that neutral or anionic compounds (at physiological pH), such as, Rose Bengal, Erythrosin, Eosin, Porphyrin derivatives (Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup> and Photogem<sup>®</sup>) and Aluminium disulphonated phthalocyanine bind efficiently and inactivate Gram positive bacteria, while in Gram negative, these photosensitizers bind to some extent to the outer membrane. However, do not effectively inactivate this bacteria after illumination. This weak affinity of negatively charged photosensitizers to Gram negative bacteria may be enhanced by linking the dye to a cationic molecule (e.g., poly-L-lysine-chlorin e6), by the use of membrane-active agents (e.g., treatment with Tris-EDTA), or by conjugating the sensitizer with a monoclonal antibody that binds to cell-surface-specific antigens (8, 10, 13, 42). Eight of the 18 selected articles studied anionic photosensitizers (Rose Bengal, Erythrosin, Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup> and Aluminium disulphonated phthalocyanine) against Gram positive bacteria. In these studies, low concentrations of Rose bengal were capable of totally eliminating bacteria (18) and caused stressing conditions in the cell viability (24). For Erythrosin, good results were also observed with different light sources and time of irradiation (29) and when this dye was compared with Methylene Blue (MB), inactivation was better with Erythrosin (14). For the Porphyrin derivatives, killing efficacy of more than 99,9% was observed against *Strep. mutans* (22). However when these photosensitizers were compared with Erythrosin and Toluidine Blue O (TBO), the latter resulted in significantly higher bacterial reduction than Porphyrins (14, 21).

On the other hand, cationic photosensitizers such as MB, TBO and Pyridinium Zn (II) Phthalocyanine are capable of inactivating both Gram positive and Gram



negative bacteria. In recent years, different chemical classes of positively charged photosensitizer, including phthalocyanines, were successfully tested as photoinactivating agents against Gram positive and Gram negative bacteria (43- 47). In general, photosensitizers with an overall cationic net charge can efficiently kill Gram negative bacteria by photosensitization even in the absence of additives (48). The resistance of Gram negative bacteria against efficient killing by anti-bacterial photodynamic therapy is due to the different outer membrane structures of Gram positive and Gram negative bacteria (48). These positively charged dyes may bind to the polyphosphates of the outside membrane and produce molecular damage to lipids and proteins, including membrane-bound enzymes (49). Another mechanism proposed for these positively charged PS is the crossing of the membrane and consequently the attraction to the negatively charged potential of mitochondria, which allows directly action on this organelle (50- 53). The articles which used cationic photosensitizers such as TBO, MB and Pyridinium Zn (II) Phthalocyanine against Gram positive bacteria obtained significant inhibition of the target bacteria with different concentrations and irradiation source and time. One study compared two anionic (Erythrosin and Photofrin<sup>®</sup>) with one cationic dye (Methylene Blue) and observed that Erythrosin was 1–2 log more effective at killing biofilm bacteria than Photofrin<sup>®</sup> and 0.5–1 log more effective than MB (14).

Another mechanism of PDI is the photosensitizer ability of penetration and action inside the cell. This is possible according to the hydrophilicity and solubility of the dyes, because it determines how readily it crosses the cellular wall (49). This may be studied by the partition behavior of the dye in water and lipid environment through the hydrophilic/hydrophobic balance of the component. An easy measurement of this behavior is the logarithm partition coefficient of the dye between two solvents (P), :

water and 1-octanol. Literature data of these values are presented in Table 3. Quantitatively, the hydrophilic characteristic is associated with  $\text{Log } P < 0$ , while the hydrophobic with values of  $\text{Log } P > +1,5$ , and the intermediate values are considered to be amphiphilic (54, 55).

Gram positive bacteria protect their cytoplasmatic membrane with a thick multilayer peptidoglycan wall that blocks the passage of hydrophobic components because of the presence of aminoacids and sugars within the cell membrane (56) and so, only hydrophilic components penetrate this wall. On the other hand, Gram negative bacteria have one or few layers of peptidoglycan and an external membrane. Because this membrane presents lipoproteic characters, special mechanisms as pores are necessary to allow the passage of hydrophilic components (56) and consequently it is expected that hydrophobic components penetrate better than hydrophilic ones. In general, the dyes may have more hydrophilic or hydrophobic tendency or may be amphiphilic. Literature considers Rose Bengal, MB and TBO, amphiphilics (both, hydrophobic and hydrophilic tendencies), of which Rose Bengal has more hydrophobic tendency, and MB and TBO more hydrophilic tendency (54). In addition Erythrosin is considered hydrophilic, and Phthalocyanine and Porphyrin derivates (Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> and Photosan<sup>®</sup>), hydrophobic. In the selected articles, hydrophobic (Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>, Aluminium disulphonated phthalocyanine and Pyridinium Zn (II) Phthalocyanine (PPC)), hydrophilic (Erythrosin) and amphiphilic (MB, TBO and Rose bengal) photosensitizers were studied. Since all the investigated bacteria were Gram positive, better results are expected with hydrophilic photosensitizers. Nevertheless, papers that tested hydrophobic dyes also obtained good results with significant inhibition of the target bacteria (14, 16, 21, 22, 26, 27). Two articles used amphiphilic

(TBO and MB), hydrophobic (Photofrin<sup>®</sup> and Photogem<sup>®</sup>) and hydrophilic (Erythrosin) photosensitizers and in both studies, the hydrophilic dye was more effective than the amphiphilic and hydrofobic ones in the inactivation of Gram positive *Strep. mutans* (14, 21). In addition, the comparison of two amphiphilic photosensitizers (TBO and MB) resulted in higher bactericidal efficacy for TBO: Its solubility should be higher in the hydrophobic region of the membrane and thus TBO could interact more easily with the bacterial membrane than MB. As a result, the TBO concentration within the bacterial cell should be significantly higher than that of MB (49). Thus, considering the fact of Erythrosin is the most hydrophilic photosensitizer and that the Gram positive bacteria allow better penetration of this group, it seems to be the most appropriated dye.

Besides the photosensitizer capability of binding to the bacterial membrane and the ability of bacterial penetration, there are reports of inactivation of bacteria, in which it is clear that the photosensitizer does not have to penetrate the cell to be effective, or, indeed, not even come into contact with the cells. According to these authors, if singlet oxygen can be generated in sufficient quantities near the outer membrane of the bacteria, it will be able to inflict damage on vital structures (57). The lifetime ( $\tau$ ) of singlet oxygen is highly dependent on the environment and when in solution it varies within the nature of the solvent. In water, the lifetime ( $\tau$ ) is around 4  $\mu$ s. For solvents that do not have C-H bonds and hydroxyl groups, the values are higher, for example, the lifetime of singlet oxygen in carbon tetrachloride, is around 30 ms and 250  $\mu$ s in chloroform. Moreover, in biological systems, singlet oxygen lifetime presents extremely low values, less than 0.04  $\mu$ s (58), which reduces its radius of action to about 0.02  $\mu$ m (59). Therefore, if the PS could not interact with the target bacteria, but the originated singlet oxygen would be generated in close

proximity to the cell, its viability could be damaged depending on the distance to the bacteria, since the lifetime of singlet oxygen is very short.

Therefore, reaching the expected therapeutic effect does not necessarily involve affinity between the bacterial wall and the PS, it is also important that the reactive products of therapy (such as singlet oxygen) are originated, because even without direct contact of the PS with the bacterium, success may be achieved. The quantity of singlet oxygen generated by the photodynamic reaction varies for each dye. This quantity is measured by its singlet oxygen quantum yield. Literature reported the oxygen production and the quantum yield values from the lowest to the highest for phthalocyanine derivatives (0,56), Methylene Blue (0,59), Toluidine Blue O (0,60), Erythrosin (0,63), Rose Bengal (0,76) and Haematoporphyrins derivatives such as Photofrin<sup>®</sup> (0,83) (60). The higher the value of the quantum yield, higher is the production of singlet oxygen, and consequently higher photodynamic efficacy.

Therefore, the choice of an appropriate photosensitizer must consider all these aspects. The first factor is the species of the target bacteria. If Gram positive, both cationic and anionic dyes may be utilized, and if Gram negative, cationic dyes would be more effective. According to the penetration of the PS in the bacteria, the water solubility of the dye should be taken into account, since hydrophilic photosensitizers have a high penetration in Gram positive bacteria, while hydrophobic in Gram negative. Moreover, if toxic and reactive products of the PDT can be created near to the bacterial membrane, even without the direct bacteria-photosensitizer contact, effective inactivation may be observed.

## **2) Are the light sources appropriated for the different dyes?**

The basic requirements for PDT light sources are to match the activation spectrum (electronic absorption spectrum) of the photosensitizer (usually the longest wavelength peak) and to generate adequate light potency at this wavelength (61). This concept was discussed for the first time by Isaac Newton in 1666, when he showed that the light-colors red, orange, yellow, green, blue and violet together compose the white light. Later, Newton presented 'the Newton disc', showing that the rotation of a disc painted with the colors that compose the white light resulted on the observation of a white disc. In the mid 19<sup>th</sup> century (1853), the polish mathematician Grassman published a theory with the concept of complementary light, showing that each color of the Newton disc has another complementary color in the same disc (62). Furthermore, in the end of 19<sup>th</sup> century, Ewald Hering developed the opponency theory, in which, he revealed that the green is the opposite color of red, the blue of yellow, explaining why we are not able to see "reddish greens" or "yellowish blues". This is in accordance with the PDT, in which the photosensitizer should have the maximum absorbance achieved by an appropriated and complementary light source, for example, a blue photosensitizer should be irradiated by a red light, which would be more absorbed and are both complementary (62).

The literature presents three main classes of clinical PDT light sources: LASER, Light emitting diodes (LED) and halogen lamps (Table 4). LASER has some advantages such as high efficiency (>90%) of coupling into single optical fibers for endoscopic, high potency and interstitial light delivery; and their monochromaticity, despite their high cost. Diode LASER presents one of the lowest prices among LASER systems it is very convenient and reliable; however they are single-wavelength devices, so a separate unit is required for each photosensitizer due to

the different absorption wavelength. LED has become a viable technology for PDT in the last few years, particularly for irradiation of easily accessible tissue surfaces. The main advantages of LED over LASER or diode LASER sources are their low cost and ease of configuring arrays of LED into different irradiation geometries. As with LASER diodes, LED have fixed output wavelength, but the cost per watt is significantly smaller, so having different sources for each photosensitizer is less of a drawback. (61). Filtered halogen lamps have the advantage that they can be spectrally filtered to match any photosensitizer; however, they cannot be efficiently coupled into optical fiber bundles or liquid light guides, and causes heating. With broadband sources the effective output potency is reduced compared with a LASER source at the photosensitizer activation peak and it is proportional to the integrated product of the source output spectrum and the photosensitizer activation spectrum. For LED and filtered halogen lamps, the output spectrum typically has a bandwidth of about 25–30 nm, so that the efficiency factor for typical photosensitizer spectra is about 50% (61).

The selected articles utilized different light sources, such as LASER, diode LASER, light emitting diodes (LED), halogen lamps and tungsten filament. Most of the papers employed phenothiazinic dyes such as TBO and MB associated with red lights (LASER or LED) (14, 17, 19- 21, 23, 25, 26, 28, 31, 32). The maximum absorbance of these components occurs at 600-660 nm and all the found articles used appropriated light sources (red color light). For TBO, the wavelength used varied from 632.8 to 660 nm, and for MB, the light sources varied between 633 and 665 nm. Other blue/green photosensitizers used were the Porphyrin derivates (Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> and Photosan<sup>®</sup>) and Phthalocyanine derivates, which have the maximum absorbance with red light, at 630 nm and at 600-700 nm respectively,

that correspond to porphyrin Q band. In these studies, Photogem<sup>®</sup> and Photofrin<sup>®</sup> were irradiated with red LED (630 nm) and Tungsten filament (600-650 nm) respectively, with success (14, 21). For the Phthalocyanine derivatives, light sources (Tungsten filament, HeNe and GaAlAs LASER) compatible with the maximum absorbance of the dye, were also employed with success (16, 26, 27). These good results were expected since the lights used emits at the region of the maximum absorption of the dyes. In contrast, for the Photosan<sup>®</sup>, a blue LED light source with wavelength of 450 nm was used; this illumination was performed at the porphyrin Soret band (22). The good results obtained with this association, nevertheless could be improved if another light source, with a more appropriated wavelength was used because irradiation at 450 nm presents lower light penetration compared to 600 – 700 nm region at the biological tissues.

Other photosensitizers reported in the articles were the red-colored, such as Rose Bengal and Erythrosin, which absorb at 561 and 530 nm, respectively. For the Rose Bengal, the employed light sources emitted wavelengths between 400-500 nm (18, 24). In these cases, improved effects would occur near the wavelength of 561 nm. Although bacteria were inactivated with this association, better results can be expected if another light source were employed. On the other hand, for Erythrosin, the articles utilized white lights with emitting wavelength of 500-550 nm, which are in accordance with the maximum absorbance of this dye (29).

The PDT is classically employed for some medical treatments which require efficient penetration of the light to reach the target lesion. Therefore, the absorption spectrum of PS must be between 600 and 800 nm for an efficient penetration of radiation. The absorption coefficient of the majority of the irrigated tissue is determined by the concentration of light-absorbing molecules (chromophores) and for

PDT wavelengths the two most important chromophores are hemoglobin and water (61). Considering this fact, the appropriated light should be red-colored in these cases, which corresponds to light penetration from 0.5 cm (at 630 nm) to 1.5 cm (at 700 nm) (63, 64). Nevertheless, in dental caries, the hemoglobin chromophore may not be present and consequently, no interference with the use of blue or green lights would exist. Despite most of the selected articles employed red light sources, the use of blue lights began to be studied and further studies are necessary for a better understanding of tissue interference in the efficiency of PDI.

Few of the selected articles investigated the effect of Erythrosin and Fuchsin (red colored compounds) as photosensitizers, and even fewer studies used halogen light or blue LED as light sources. Both photosensitizers and lamps are present in the dental routine, and can be used in PDI without requiring acquisition of new equipments. Similarly, no evidence was found of the association of these dyes with the light sources used to activate resin composites.

Thus, the choice of an appropriate photosensitizer and light source must consider the maximum absorbance wavelength of the dye, the emitting wavelength of the light source and the characteristics of the target tissue. Further studies are necessary employing dental routine materials from the including dyes such as Erythrosin, Malachite Green, Fuchsin and light sources such as halogen lamps and LED, which may facilitate the inclusion of PDT in the dental practice.

### **3) How can the dye concentration influence the effectiveness of the therapy?**



PDT may be classified inside the photophysical and photochemical studies. A common problem found in this kind of study is the formation of dye self-aggregates in aqueous media, as aggregation usually impairs its therapeutic response (65). The formation of aggregates modifies the absorption spectrum and photophysical properties of the dye and affects its ability to emit at a certain wavelength or to act as a photosensitizer (66). In the aggregate state, the PS undergoes a process named as energy self-quenching, diminishing the PS excited state form, which reduces the singlet oxygen production (67). The aggregation generally occurs when the concentration of the dye increases, especially for hydrophobic dyes, with reactions in the aqueous media between the monomeric forms of the dye to generate dimers or higher self-aggregated forms. In low concentrations, there is a monomeric predominance and the spectrum of the dye generally presents its predominant band. On the other hand, as the concentration increases, an additional band sometimes appears and the absorption of the dye may be modified. The strength of the aggregation between two or more dye molecules depends on the structure of the dye (hydrophobic-hydrophilic balance), the solvent, the temperature, and the presence or absence of electrolytes (66). In general, dyes aggregate more strongly in water than in organic solvents, and more generally still in solutions of high ionic strength. Usually, the presence of alcohol or glycerol in a concentrated aqueous solution of a dye prevents the formation of aggregates. The microenvironment where the PS is located also exerts a strong influence in the aggregated state. High salt concentrations favor the formation of dimers, and the presence of electrolytes and interfaces may induce the formation of aggregates by concentrating the dye in the interface (68). Despite that, micelles and liposomes are convenient drug delivery

systems in PDT/PDI because at reasonable concentration of the PS, its molecules are maintained as monomers (69).

This review focuses on the influence of dye concentration, the possible formation of aggregates and interference on the absorption spectra of the dye. According to what was observed earlier, the most studied dyes were MB and TBO in several concentrations. Both TBO and MB are metachromatic dyes, which in high concentrations present changes in the absorption spectrum due to electrostatic and hydrophobic alterations between the dye molecules and adjacent molecules. This interaction results in dye aggregation, with formation of dimers and oligomeric forms. This process generally decreases the peak of maximum absorption of the monomer and increases the peak of the dimers which in the case of MB and TBO present lower wavelengths (70, 71). The role of monomers and dimers in the lethal photosensitization is not clear, but their wavelengths of maximum absorption are different. For MB, the wavelength of maximum absorption is 660 nm, whereas for its dimer form is 610 nm. For TBO, the wavelength of maximum absorption in the monomeric form is 630 nm, whereas for the dimeric form this wavelength decreases to 590 nm (71). By changing the wavelength of the irradiation source, it is observed that both species can be effective in microbial inactivation (71). In the presence of higher amount of aggregates, the irradiation of dimers produces the same effect of the irradiation of monomers, which demonstrates equal participation in the photodynamic effect. The photochemistry of monomers of MB involves increased production of singlet oxygen (Type II mechanism, energy transfer reaction), while the dimers have a higher yield for Type I reactions (involving electron transfers reaction). Therefore, the two types of reactions can be important for the photodynamic process (50). Literature also shows that in concentrations up to 30  $\mu\text{mol/L}$  ( $10\mu\text{g/mL}$ -0.01

mg/mL) of TBO, the dimers band contributes more than the monomeric one (50, 71). In the analyzed articles, the employed concentrations for TBO were 0.005; 0.01; 0.025; 0.1 and 13 mg/mL which were irradiated with wavelengths of 630 nm; 633 nm; 638.8 nm; 640 nm and 660 nm (17, 19, 20, 21, 23, 28, 32). Considering concentrations above 0.01 mg/mL the dimers band is predominant, only the concentration of 0.005 mg/mL would the monomers band be predominant for the investigated wavelengths (630 nm). Higher concentrations of this dye would be better activated by light sources of 630 and 590 nm, since both monomer and dimer bands would be present, with predominance of the dimeric form. For the MB, the studies used concentrations of 0.005; 0.007; 0.01; 0.025; 0.032 and 1 mg/mL with light sources of 600 nm; 640 nm; 650 nm and 665 nm (14, 32). The maximum absorbance of the monomeric form happens at 660 nm, and this occurs until the concentration of  $10^{-6}$  mol/L (0.0003 mg/mL). When higher concentrations are employed, the dimers begin to manifest with a wavelength of 610 nm. The selected articles employed concentrations in which both monomeric and dimeric forms were present, with predominance of dimers. As it can be seen, only one study used an appropriated light source for the dimer solution (600 nm), which would achieve its maximum absorbance. However, the ideal situation would be the use of light sources emitting two wavelengths (660 and 610 nm) which would act in both monomers and dimers.

In the case of Fluorescein, Eosin, Erythrosin and Rose bengal there are reports of formation of trimers and high aggregates in aqueous solution (66). In addition, it is normally observed that the aggregation of these xanthenes in ethanol and other organic solvents is considerably weaker than in aqueous solution (66). For Rose Bengal, the monomeric form exists up to a concentration of  $5 \times 10^{-5}$  mol/L (0.05 mg/mL), which presents maximum absorbance in the wavelength of 550 nm (66)

When the concentrations are higher, the absorption spectrum of the dimers becomes visible at 490 nm. Two articles studied this dye in the concentrations of 0.05 and 0.00009 mg/mL (18, 24). Both studies utilized low concentrations with predominance of monomers which requires light sources of 550 nm. Nevertheless, the irradiation employed wavelength varying from 400 to 500 nm, which seems to be inappropriate for this solution, despite the good results found. For Erythrosin, at concentrations lower than  $5 \times 10^{-6}$  mol/L (0.004 mg/mL), the absorption spectra are identical for monomers with maximum absorption at 530 nm. Between  $5 \times 10^{-5}$  and  $10^{-4}$  mol/L, respectively 0.04 and 0.4 mg/mL, the spectra start to exhibit a general broadening and a slight blue shift with respect to the monomeric spectra. At higher concentration ( $2.5 \times 10^{-3}$  mol/L  $\sim$  2.64 mg/mL) there are formations of oligomeric structures manifested by the blue shift, which is illustrated by the formation of a second band in the wavelength of 510 nm (72). Two studies investigated this photosensitizer with the concentration of 0.019 mg/mL. Comparing these values with the literature, it can be noted that in this concentration there is both monomeric and oligomeric forms, with predominance of monomeric and consequently light sources with wavelengths in accordance to the maximum absorbance of the dye were utilized (500-550 nm).

In the case of Phthalocyanine derivatives, a strong tendency to form inactive dimers and higher aggregates is present. This process is favored in aqueous suspension due to the highly hydrophobic core of the dye. Literature reports that the derivative AlPcS<sub>2</sub> do not aggregate in the concentrations between 0.25 and  $7.0 \times 10^{-6}$  mol/L with the predominance of the monomeric band and absorption in the wavelength of 660 nm (73). Higher concentrations generally show a second band relative to the dimers in the wavelength of 600 nm (73). The papers that utilized this dye tested concentrations of 0.1 and 0.02 mg/mL, which are higher than the solution

of predominance of monomers and consequently requires light sources of 600 nm. However, only one study used an appropriated irradiation source (600-700 nm) with a broad spectrum of emission, since in these concentrations both forms of the dye are present.

The Porphyrin derivatives (Photofrin<sup>®</sup>; Photogem<sup>®</sup> and Photosan<sup>®</sup>) in general present monomeric band of absorbance in the wavelength of 630 nm up to the concentration of  $1.8 \times 10^{-6}$  mol/L (0.002 mg/mL) (74). When the concentration of the dye in solution exceeds this value, a second band in the region of 600 nm appears, changing the maximum absorbance of the photosensitizer. In the analyzed articles (14, 21, 22), these dyes were employed in the concentrations of 0.0005; 0.001; 0.005; 0.01; 0.026; 0.05; 0.1; 1; 2; and 3 mg/mL with light sources of 450, 600, 630 and 650 nm. It can be noted that the concentrations of 0.0005 and 0.001 mg/mL would present only monomeric forms, however, that study did not use the most suitable light source (450 nm) (22). For the other higher concentrations both monomers and dimers are present in the solution, which requires the irradiation with light sources of 630 and 600 nm wavelengths. This happened in the study of Wood *et al.* (14), in which the wavelength utilized varied from 600 to 650 nm with solutions of photosensitizers with both monomeric and dimeric bands (0.026 mg/mL). The other studies used light sources with maximum absorbance for the monomers, despite the presence of dimers in the solution.

A summary of the maximum absorption and concentration of the analyzed dyes are showed in the Table 5. Considering the discussed aspects, the selection of a photosensitizer must take into account its photophysical characteristics to determine the appropriated concentrations that will be studied. In addition, higher

concentrations may require light sources with different wavelengths, according to the absorption alterations induced by the aggregation properties of the dye.

Despite all above considerations, the main PDT/PDI treatment is considered type II mechanism, *via* singlet oxygen as reactive specie that induces the biological cellular damage (60, 75). Therefore the use of self-aggregated dyes as photosensitizers usually should be avoid hoping future establishment of Dentistry clinical use of this therapy, since lower concentrations would provide low toxicity; high solubility and unlikely dental staining.

So, some articles could have their good results improved if some of these aspects were taking into account and future studies may considerer these facts for better results.

## **Conclusions**

This manuscript identified that some photosensitizers may be more effective against Gram positive or Gram negative bacteria; that the maximum absorbance of the dye should be achieved by the light source and that the absorbance of the photosensitizer can be modified according to the concentration, salt presence and the environment of the PS location. For the optimal results of PDI against cariogenic bacteria, structural properties of the bacteria membrane, concentration, solubility and polarity of the photosensitizers, and light source should be considered.

## **References**

1. PETERSEN PE, BOURGEOIS D, OGAWA H, ESTUPINAN-DAY S, NDIAYE C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*, 2005; **83**: 661-669.
2. ELDESTEIN BL. The dental caries pandemic and disparities problem. *BMC Oral Health*, 2006; **6**: 1-5.
3. TENNANT M, NAMJOSHI D, SILVA D, CODDE J. Oral health and hospitalization in western Australian children. *Aust Dent J*, 2000; **45**: 204–207.
4. MOURADIAN WE, WEHR E, CRALL JJ. Disparities in children's oral health and access to dental care. *JAMA*, 2000; **284**: 2625-2631.
5. SELWITZ RH, ISMAIL AI, PITTS NB. Dental caries. *Lancet*, 2007; **369**: 51–59.
6. KONOPKA K, GOSLINSKI T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, 2007; **86**: 694-707.
7. HAMBLIN MR, NEWMAN EL. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B*, 1994; **23**: 3– 8.
8. HAMBLIN MR, HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, 2004; **3**: 436-450.
9. DOLMANS DEJGJ, FUKUMURA D, JAIN RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003; **3**: 380–387.
10. WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*, 1998; **42**: 13–28.
11. MEISEL P, KOCHER T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*, 2005; **79**: 159-170.

12. O'RIORDAN K, AKILOV OE, HASAN T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2005; **2**: 247-262.
13. KÖMERIK N, MACROBERT AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2006; **25**: 487-504.
14. WOOD S, METCALF D, DEVINE D, ROBINSON C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2006; **57**: 680-684.
15. DONNELLY RF, MCCARRON PA, TUNNEY MM, WOOLFSON A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth: design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*, 2007; **86**: 59-69.
16. WILSON M, BURNS T, PATTERSON J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother*, 1996; **37**: 377-381.
17. WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ, 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.
18. PAULINO T P, RIBEIRO K F, THEDEI G, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 2005; **50**: 353-359.
19. ZANIN ICJ, LOBO MM, RODRIGUES LKA, PIMENTA LAF, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*, 2006; **114**: 64-69.



20. BEVILACQUA IM, NICOLAU RA, KHOURI M, BRUGNERA JR A, TEODORO GR, ZÂNGARO RA, PACHECO MTT. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg*, 2007; **25**: 513-518.
21. GIUSTI JSM, SANTOS-PINTO L, PIZZOLITO AC, HELMERSON K, CARVALHO-FILHO E, KURACHI C, BAGNATO VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*, 2008; **26**: 281-287.
22. MAISCH T, WAGNER J, PAPASTAMOU V, NERL HJ, HILLER AK, SZEIMIES RM, SCHMALZ G. Combination of 10% EDTA, Photosan®, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *J Appl - Microbiol*, 2009; **107**: 1569–1578.
23. LIMA JPM, MELO MAS, BORGES FMC, TEIXEIRA AH, STEINER-OLIVEIRA C, SANTOS MN, RODRIGUES LKA, ZANIN ICJ. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*, 2009; **117**: 568–574.
24. BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI JR, G.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic Therapy with Rose Bengal Induces GroEL Expression in *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg*, 2010; **28** (Suppl): 79S-84S.
25. DOBSON J, WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. *Arch Oral Biol*, 1992; **37**: 883-887.
26. BURNS T, WILSON M, PEARSON GJ. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol*, 1995; **38**: 401-405.
27. WOOD S, NATTRESS B, KIRKHAM J, SHORE R, BROOKES S, GRIFFITHS J, ROBINSON C. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment

- of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B*, 1999; **50**: 1-7.
28. ZANIN JCI, GONÇALVES RB, BRUGNERA JR A, HOPE CK, PRATTEN J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother*, 2005; **56**: 324-330.
29. METCALF D, ROBINSON C, DEVINE D, WOOD S. Enhancement of erithrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*, 2006; **58**: 190-192.
30. HOPE CK, WILSON M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. *J Antimicrob Chemother*, 2006; **57**: 1227–1230.
31. MÜLLER P, GUGGENHEIM B, SCHMIDLIN PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci*, 2007; **115**: 77–80.
32. ARAÚJO PV, TEIXEIRA KI, LANZA LD, CORTES ME, POLETTO LT. *In vitro* lethal photosensitization of *Streptococcus mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*, 2009; **22**: 93-97.
33. VAN HOUTE J. Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res*, 1994; **73**: 672–681.
34. BALAKRISHNAN M, SIMMONDS RS, TAGG JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J*, 2000; **45**: 235–245.
35. HOSHINO E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res*, 1985; **64**: 1195–1198.
36. HAHN CL, FALKLER WA, MINAH GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol*, 1991; **36**: 147–153.

37. MASSEY WL, ROMBERG DM, HUNTER N, HUME WR. The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpitis. *Oral Microbiol Immunol*, 1993; **8**: 30–35.
38. MARTIN FE, NADKARNI MA, JACQUES NA, HUNTER N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol*, 2002; **40**: 1698–1704.
39. GOMES BP, LILLEY JD, DRUCKER DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent*, 1996; **24**: 47–55.
40. SUNDE PT, OLSEN I, DEBELIAN GJ, TRONSTAD L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod*, 2002; **28**: 304–310.
41. PERUSSI JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quím Nova*, 2007; **30**: 988-994.
42. ROVALDI CR, PIEVSKY A, SOLE NA, FRIDEN PM, ROTHSTEIN DM, SPACCIAPOLI P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; **44**: 3364–3367.
43. MAISCH T, BOSL C, SZEIMIES RM, LEHN N, ABELS C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; **49**:1542–1552.
44. MERCHAT M, SPIKES JD, BERTOLONI G, JORI G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B*, 1996; **35**: 149–157.
45. MINNOCK A, VERNON DI, SCHOFIELD J, GRIFFITHS J, PARISH JH, BROWN SB. Mechanism of uptake of a cationic watersoluble pyridinium zinc phthalocyanine

across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; **44**: 522–527.

46. MINNOCK A, VERNON DI, SCHOFIELD J, GRIFFITHS J, PARISH JH, BROWN ST. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 1996; **32**: 159–164.

47. SEGALLA A, BORSARELLI CD, BRASLAVSKY SE, SPIKES JD, RONCUCCI G, DEI D, CHITI G, JORI G, REDDI E. Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine. *Photochem Photobiol Sci*, 2002; **1**: 641–648.

48. MAISCH T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, 2007; **22**: 83–9.

49. USACHEVA MN, TEICHERT MC, BIEL MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 2001; **29**: 165-173.

50. JUNQUEIRA HC, SEVERINO D, DIAS LG, GUGLIOTTI M, BAPTISTA MS. Modulation of the methylene blue photochemical properties based on the absorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys*, 2002; **4**: 2320-2328.

51. MELLISH KJ, COX RD, VERNON DI, GRIFFITHS J, BROWN SB. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol*, 2002; **75**: 392-397.

52. SEVERINO D, JUNQUEIRA HC, GUGLIOTTI M, GABRIELLI DS, BAPTISTA MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol*, 2003; **77**: 459-468.

53. WAINWRIGHT M. The development of phenothiazinium photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2005; **2**: 263-272.
54. WAINWRIGHT M, GIDDENS RM. Phenothiazinium photosensitizers: choice in synthesis application. *Dyes Pigm*, 2003; **57**: 245-257.
55. WANG H, LU L, ZHU S, LI Y, CAI W. The phototoxicity of xanthenes derivatives against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol*, 2006; **52**: 1-5.
56. SCHAECHTER M, ENGLEBERG NC, EISENSTEIN BI, MEDOFF G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*, 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
57. DAHL TA, MIDDEN WR, HARTMAN PE. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria, *Photochem Photobiol* 1987; **46**: 345–352.
58. OCHSNER M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J Photochem Photobiol B*, 1997; **39**: 1-18.
59. DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW, JORI G, KESSEL D, KORBELIK M, MOAN J, PENG Q. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1998; **90**: 889-905.
60. DEROSA MC, CRUTCHLEY RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*, 2002; **233-234**: 351-371.
61. WILSON BC, PATTERSON MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*, 2008; **53**: 61–109.
62. PARAMEI G. Color space of normally sighted and color-deficient observers reconstructed from color naming. *Psychol Sci*, 1996; **7**: 311-317.
63. SALVA KA. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol*, 2002; **20**: 571-581.

64. KÜBLER AC. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl*, 2005; **20**: 37-45.
65. DARIO ME, ROMÁN ES. Aggregation and photophysics of rose bengal in alumina-coated colloidal suspensions. *Helv Chim Acta*, 2001; **84**: 2601-2614.
66. VALDES-AGUILERA O, NECKERS DC. Aggregation phenomena in xanthene dyed. *Acc Chem Res*, 1989; **22**: 171-177.
67. SIMPLICIO FI, MAIONCHI F, HIOKA N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no Desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*, 2002; **25**: 801-807.
68. CAETANO W, TABAK M. Interaction of Chlorpromazine e trifluoperazine with anionic sodium dodecil sulfate SDS micelles: electronic absorption and fluorescence studies. *Journal of Colloid and Interface Sciences*, 2000; **225**: 69-81.
69. HIOKA N, CHOWDHARY RK, CHANSARKAR N, DELMARRE D, STERBERG E, DOLPHIN D. Studies of a benzoporphyrin derivative with pluronics; *Can J Chem*, 2002; **80**: 1321-1326.
70. BERGMAN K, O'KONSKI CT. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer and complexes with montmorillonite. *J Phys Chem*, 1963; **67**: 2169-2177.
71. USACHEVA MN, TEICHERT MC, BIEL ME. The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 2003; **71**: 87-98.
72. STOMPORST RG, ZWAN G, ZANDVOORT MAMJ, SIEVAL AB, ZUILHOF H, VERGELDT FJ, SCHAAFSMA TJ. Spectroscopic study of erythrosin B in PVA films. *J Phys Chem A*, 2001; **105**: 4235-4240.

73. DHAMI S, PHILLIPS D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. *J Photochem Photobiol A Chem*, 1996; **100**: 77-84.

74. PASTERNAK RF, HUBER ZPR, BOYD P, ENGASSER G, FRANCESCONI ZL, GIBBS E, FASELLA P, VENTURO GC, HINDS LC. On the aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. *J Am Chem Soc*, 1972; **94**: 4511-4517.

75. RYTER SW, TYRRELL RM. Singlet molecular oxygen ( $^1O_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med*, 1998; **24**: 1520–1534.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Antimicrobial effectiveness of PDI: (A) Photosensitizer capability of interacting and acting to the bacterial membrane; (B) Photosensitizer ability of penetration and action inside the cell and (C) Reactive singlet oxygen formation around the bacterial cell.

## TABLES

Table 1. Studies about PDI and dental caries.

Study	Microorganism	Photosensitizer	Light source	Irradiation time (min)	Power (mW)
DOBSON & WILSON (25)	<i>In vitro</i> (Biofilms of <i>Streptococcus sanguis</i> ; <i>Porphyromonas</i> )	Toluidine Blue O (TBO) and Methylene Blue	HeNe LASER (633 nm)	0.5	7.3

---

	<i>gingivalis</i> ;	(MB)					
	<i>Fusobacterium</i>						
	<i>nucleatum</i> ;						
	<i>Aggregatibacter</i>						
	<i>actinomycetencomitans</i> )						
<b>BURNS et al. (26)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	TBO and Aluminium disulphonated phthalocyanine (AlPcS <sub>2</sub> )	HeNe LASER (633 nm) or GaAIAs LASER (660 nm)		NR	NR	
<b>WILSON et al. (16)</b>	<i>In vitro (Strep. sanguis)</i>	AlPcS <sub>2</sub> (0.1 mg/mL)	GaAIAs LASER (660 nm)		NR	11	
<b>WOOD et al. (27)</b>	<i>Biofilm in situ</i>	Pyridinium Zn (II) Phthalocyanine (PPC) (0.02 mg/mL)	Tungsten filament lamp white light 600-700 nm)		30	400	
<b>WILLIAMS et al. (17)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	TBO (13 mg/mL)	Diode LASER (633 nm)		0,08–1	20-80	
<b>PAULINO et al. (18)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans and fibroblasts)</i>	Rose bengal (0-0.05 mg/mL)	Photopolimerizer (400-500 nm)		0-0.67	NR	
<b>ZANIN et al. (28)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	TBO (0.1 mg/mL)	Diode LASER (632.8 nm) / HeNe Laser (638.8 nm)		5, 15 and 30	32	
<b>METCALF et al. (29)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	Erythrosin (0.019 mg/mL)	White light (500-550 nm)		5X1min / 10X0.5	NR	

---



					min	
<b>WOOD et al. (24)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	Erythrosin (0.019 mg/mL), Photofrin® (0.026 mg/mL) and MB (0.007 mg/mL)	Tungsten filament (500-550/600-650 nm)		15	400
<b>HOPE &amp; WILSON (30)</b>	<i>In vitro (Streptococcus pyogenes)</i>	Sn IV Chlorin e6 (0.05 mg/mL)	HeNe (543 nm) / Argon LASER (488 nm)		2.67	NR
<b>ZANIN et al. (19)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans / Streptococcus sobrinus / Strep. sanguinis)</i>	TBO (0.1 mg/mL)	Red LED (638.8 nm)		7	32
<b>MÜLLER et al. (31)</b>	<i>In vitro (Actinomyces naeslundii / Veillonella dispar / Fusobac. nucleatum / Strep. sobrinus / Streptococcus oralis / Candida albicans)</i>	MB	Diode LASER (665 nm)		1	75
<b>BEVILACQUA et al. (20)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	TBO (0.1 mg/mL)	LED (640nm)		3	116
<b>GIUSTI et al. (21)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans and Lactobacillus acidophilus)</i>	Photogem® (1, 2, 3 mg/mL) e TBO (0.025, 0.1 mg/mL)	Red LED (630 nm)		1 and 2	200
<b>MAISCH et al.</b>	<i>Strep. mutans;</i>	Photosan®	Blue LED (450 nm)		1 and 2	NR

<b>al. (22)</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Aggregat. actinomycetemcomitans</i>	(0.0005; 0.001; nm) 0.005; 0.01; 0.05; 0.1 mg/mL)				
<b>LIMA et al. (23)</b>	<i>In situ (Strep. mutans)</i>	TBO (0.1 mg/mL)	Red LED (638.8 nm)	5 and 10	40	
<b>ARAÚJO et al. (32)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	TBO and MB (0.025; 0.01 and 0.005 mg/mL)	Red LASER	1		NR
<b>BOLEAN et al. (24)</b>	<i>In vitro (Strep. mutans)</i>	Rose Bengal (0.00009 mg/mL)	Photopolimerizer (400-500 nm)	4X 0.5 min		NR

\* NR, not reported.

Table 2. Questions for the PDI articles analyses

- 1) Which photosensitizers are more effective against specific groups of dental caries bacteria?
- 2) Are the light sources appropriated for the different dyes?
- 3) How can the dye concentration influence the effectiveness of the therapy?

Table 3. Logarithm partition (Log P) of some photosensitizers (\*).

Photosensitizer	Log P	Characteristic
<b>Rose Bengal</b>	0,66	amphiphilic
<b>Methylene Blue</b>	0,41	amphiphilic
<b>Toluidine Blue</b>	0,23	amphiphilic
<b>Erythrosin B</b>	-0,35	hydrophilic

\* WAINWRIGHT & GIDDENS (54); WANG *et al.* (55).

Table 4. Three main groups of PDT light sources and their characteristics (\*).

Type of Light Source	LASER	LED	Halogen lamps
<b>Efficiency (single optical fibers)</b>	high (>90%)	low (25-50%)	high (>50%)
<b>Cost</b>	high	low	high
<b>Wavelength</b>	single	region ( $\pm$ 30 nm)	broad (400-500 nm)
<b>Heating</b>	yes	yes	yes

\* WILSON & PATTERSON (61).

Table 5. Maximum absorption and concentration of photosensitizer solution on the monomeric and aggregated forms.

Photosensitizer	Absorption of Monomers (nm)	Maximum concentration with predominance of Monomers (mg/mL)	Absorption of Aggregates (nm)
<b>TBO*</b>	630	0.01	590
<b>MB*</b>	660	0.0003	610
<b>Erythrosin**</b>	530	0.004	510
<b>Rose Bengal<sup>†</sup></b>	550	0.05	490
<b>Phthalocyanine<sup>§</sup></b>	660	0.0000007	600
<b>Porphyrin<sup>ϕ</sup></b>	630	0.002	600

\* BERGMAN & O'KONSKI (70); USACHEVA *et al.* (71)

\*\* STOMPHORST *et al.* (72)

<sup>†</sup> VALDES-AGUILERA & NECKERS (66)

§ DHAMI & PHILLIPS (73)

ϕ PASTERNAK *et al.* (74)

## FIGURES

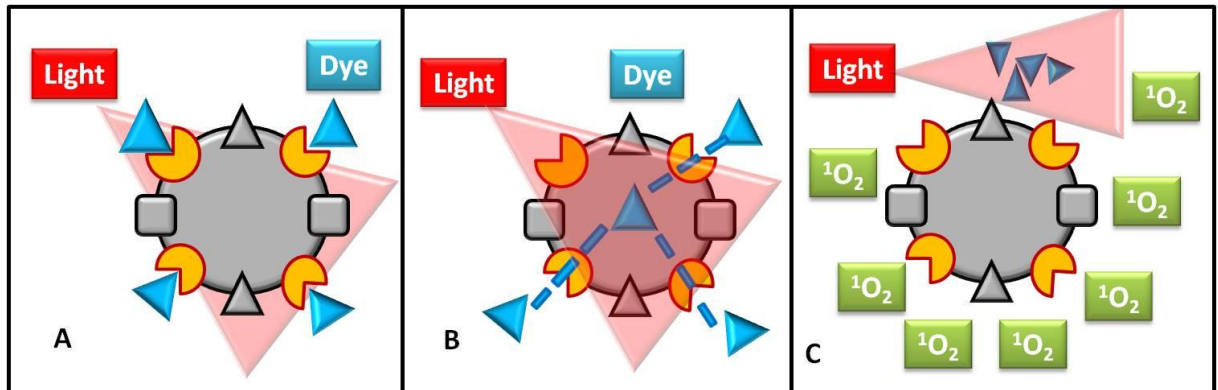


Figure 1. Antimicrobial effectiveness of PDI: (A) Photosensitizer capability of interacting and acting to the bacterial membrane; (B) Photosensitizer ability of penetration and action inside the cell and (C) Reactive singlet oxygen formation around the bacterial cell.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTODINÂMICAS DA ERITROSINA ASSOCIADA À LUZ HALÓGENA DO FOTOPOLIMERIZADOR NA ODONTOLOGIA**

## Resumo

A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se no uso de uma substância fotosensibilizante, que na presença de fonte de luz adequada, produz agentes fototóxicos para microrganismos, células tumorais, tecidos alterados entre outros. Existem materiais da rotina odontológica que poderiam ser utilizados na Terapia Fotodinâmica como a eritrosina e o fotopolimerizador de resinas compostas. Entretanto, até o momento nenhum trabalho avaliou as propriedades fotodinâmicas dessa associação. Com isso, este trabalho se propõe a quantificar a produção de oxigênio singlete da eritrosina associada à lâmpada halógena (fotopolimerizador); avaliar *in vitro* a profundidade de penetração da eritrosina em dentina e, avaliar *in vitro* a profundidade de penetração de luz halógena em dentina. A produção de oxigênio singlete foi avaliada pelo teste do ácido úrico em solução aquosa; a penetração do corante, com a utilização de blocos de dentina pela técnica Espectroscopia Fotoacústica e a penetração da luz, com o emprego de um potenciômetro em blocos de dentina. Com relação à produção de oxigênio singlete, essa associação promoveu 24,17% de degradação de ácido úrico em um minuto e rendimento quântico de 0,82. A eritrosina apresentou profundidade de penetração em dentina entre 600 e 850  $\mu\text{m}$ , com 5% da quantidade total do corante em 283  $\mu\text{m}$  de espessura. E a luz do fotopolimerizador, mostrou potência transmitida pela amostra em até 2,5 mm de espessura de dentina. Dessa forma, observou-se que a associação eritrosina e fotopolimerizador apresentaram resultados fotodinâmicos promissores, mostrando-se como uma associação vantajosa para o uso na prática clínica.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica; eritrosina; fotopolimerizador; oxigênio singlete

## Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) employs a photosensitizing substance and an appropriate light source, which produce phototoxic agents for microorganisms, tumor cells, altered tissues and others. There are routine dental materials that could be employed on Photodynamic Therapy such as erythrosin and composite resin photopolymerizer. However, no study has evaluated the photodynamic properties of this association. Therefore, this study aims to quantify the production of singlet oxygen of erythrosin associated with a halogen lamp (photopolymerizer); evaluate *in vitro* the penetration depth of erythrosin in dentin and, measure *in vitro* the penetration depth of halogen light in dentin. The oxygen singlet production was assessed by the uric acid test in aqueous solution; the photosensitizer penetration, with the use of dentin blocks by the Photoacoustic Spectroscopy technique, and the light penetration, with the use of a power meter in dentinal blocks. Regarding the singlet oxygen production, this association generated 24,17% of uric acid degradation in one minute, and quantum yield of 0,82. Erythrosin presented depth penetration in dentin between 600 and 850  $\mu\text{m}$ , with 5% of the whole quantity of the photosensitizer in 283  $\mu\text{m}$  of depth. And the light of the photopolymerizer showed transmitted potency from the sample up to 2,5 mm of dentin. Thus, it was observed that the association between erythrosin and photopolymerizer presented promising photodynamic results, and demonstrated being a useful association for clinical practice.

**Key-words:** Photodynamic therapy; erythrosin; photopolymerizer; singlet oxygen



## 1. Introdução

A cárie dentária é ainda um grande problema de saúde pública na maioria dos países industrializados, afetando mais de 50% das crianças, aproximadamente 80% dos adolescentes (Mouradian et al., 2000) e quase 100% da população adulta (Petersen et al., 2005). O processo da cárie é passível de prevenção antes de resultar em cavidades, por meio de medidas como fluoretação das águas de abastecimento, selantes dentários, uso de cremes dentais fluoretados e uma dieta apropriada (Mouradian et al., 2000). Entretanto, a falta desses cuidados preventivos pode levar à progressão dessa doença, com o desenvolvimento de cavitações. Seu tratamento clássico envolve a remoção do tecido cariado com posterior preenchimento com material adequado, o qual, durante um longo período de tempo a partir do início do século XX, tem sido encarado como a solução para as cavitações pelos cirurgiões-dentistas (Selwitz et al., 2007).

Mais recentemente, uma visão atual que rege a Dentística Contemporânea com procedimentos de mínima intervenção e máxima conservação têm sido desenvolvidas, por meio da realização de micro-restaurações com o uso de sistemas adesivos e de preparos conservadores com remoção mínima do tecido cariado (Granville-Garcia et al., 2009). Estes procedimentos conservadores justificam-se, pois nenhum material restaurador substitui o tecido dentário, não havendo necessidade de realizar remoção de tecido sadio com finalidade de prevenir outras cáries no mesmo dente, também denominada extensão preventiva (Porto, 2008). Dentro do contexto de procedimentos conservadores, há também as situações de lesões profundas, em que se realiza a remoção parcial do tecido cariado, envolvendo apenas a dentina superficial infectada e posterior selamento da

cavidade. Este método tem sido defendido uma vez que bactérias cariogênicas isoladas de sua fonte nutritiva por uma restauração com suficiente integridade morrem ou permanecem em um estado quiescente, não constituindo risco à saúde dentária (Ricketts et al., 2006; Thompson et al., 2008). Entretanto, ainda existem controvérsias quanto à manutenção dessa dentina afetada e contaminada por bactérias, assim como a própria resistência por parte dos profissionais em manter essa camada na tentativa de conservação (Kidd, 2004; Thompson et al., 2008).

Neste contexto de surgimento de novas terapias com abordagem minimamente invasiva, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como possível coadjuvante, uma vez que tem mostrado eficácia contra microrganismos envolvidos no processo da cárie dentária (Baptista, 2009; Maisch et al., 2009; Lima et al., 2009; Araújo et al., 2009; Bolean et al., 2010), além de proporcionar vantagens como rápida morte da célula bacteriana (Zanin et al., 2003). A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de terapia que emprega a combinação de luz visível em comprimento de onda adequado, um corante, chamado de fotossensibilizador e oxigênio molecular geralmente presente nos tecidos (Paulino et al., 2005). A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células (Machado, 2000). Isso é resultado da reação envolvida, que decorre primariamente da excitação eletrônica do corante pela luz, seguida de dois mecanismos principais de reação, a partir do seu estado excitado: (1) transferência de elétrons (Mecanismo tipo I) entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental e resultar em produtos oxidados ou da (2) transferência de energia (Mecanismo tipo II) do

fotossensibilizador no estado triplete, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico (Machado, 2000). Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente, com aplicação principalmente no tratamento da degeneração macular (Wormald et al., 2007), do alívio de alguns sintomas do câncer de esôfago e de pulmão e para o tratamento das lesões pré-cancerígenas em pacientes com esôfago de *Barret* (Dolmans et al., 2003). Além das aplicações oncológicas, microrganismos também podem ser mortos por luz visível depois de tratamento com um fotossensibilizador apropriado e luz, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (“PDI, Photodynamic Inactivation”). Neste processo de Inativação Fotodinâmica (PDI), a reação tipo II com formação de oxigênio singlete parece ser a principal envolvida. O oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) refere-se a uma forma excitada do oxigênio molecular e é capaz de reagir com uma variedade de substratos biologicamente importantes (Dahl et al., 1989). Diante da importância da formação de oxigênio singlete para o efeito terapêutico desejado, torna-se importante quantificar e comparar a produção deste agente pelos fotossensibilizadores que estão sendo pesquisados.

Considerando o potencial antimicrobiano da TFD e a possibilidade de inativação das bactérias da dentina cariada, o emprego de materiais presentes na rotina odontológica pode ser uma estratégia simples, viável, de baixo custo e promissora para a máxima conservação de estrutura dentária, diminuindo a destruição do dente e até mesmo podendo evitar o tratamento endodôntico. Entretanto, até o momento nenhum trabalho avaliou a associação da eritrosina utilizada em evidenciadores de biofilme dental iluminada por uma fonte de luz halógena como o fotopolimerizador de resinas compostas para a inativação de microrganismos cariogênicos. Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram

quantificar a produção de oxigênio singlete da eritrosina associada a uma lâmpada halógena; avaliar *in vitro* a profundidade de penetração da eritrosina em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica e, avaliar *in vitro* a profundidade de penetração de luz halógena em dentina.

## 2. Materiais e Métodos:

### 2.1. Fotossensibilizador:

O corante eritrosina (Vetec<sup>®</sup>) (figura 2) com absorção na região de 450 a 560 nm, e pico em 526 nm (figura 3) foi utilizado nesta pesquisa. Para a quantificação de oxigênio singlete foram utilizadas as concentrações de 1,13; 2,82 e 5,65 x 10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> e para a avaliação da profundidade de penetração a concentração de 57x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, todas preparadas em água destilada. Após o preparo, foram armazenadas sob refrigeração a 15<sup>o</sup> C e protegidas da luz para evitar degradação.

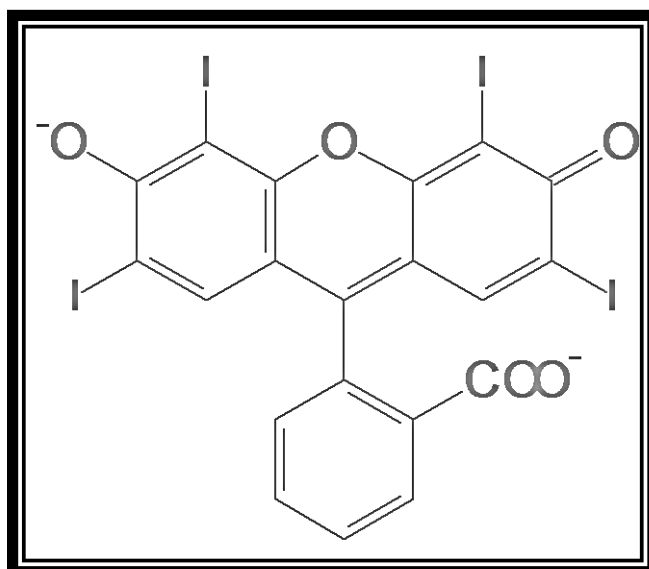


Figura 2. Estrutura química da eritrosina.

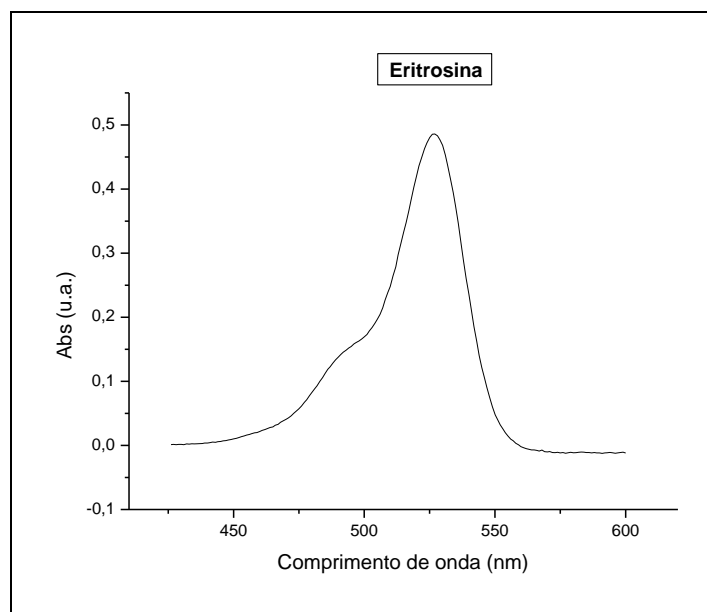


Figura 3. Espectro de absorção da eritrosina (solução aquosa,  $5,65 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ) ( $\lambda_{\text{máx}} = 526 \text{ nm}$ ).

## 2.2. Sistemas de Fontes de Luz

Para os experimentos foram utilizadas as seguintes fontes de luz:

- 1) Luz halógena: Fotopolimerizador de Resinas Compostas (Kondortech<sup>®</sup>) (figura 4), com emissão entre 374 e 525 nm (máximo em 485 nm) (figura 5) e potência de 232 mW.
- 2) Diodo Emissor de Luz (LED) verde: conjunto de iluminação com LED (fabricante SunLed) constituído por seis dispositivos (figura 6) com emissão entre 490 e 580 nm, (máximo em 520 nm) e potência de 2,11 mW (figuras 7).

Os espectros de emissão da luz halógena e do LED foram obtidos em um espectrofluorímetro (Cary Eclipse) e a potência individual dessas lâmpadas foi

mensurada com um Handheld Laser Power Meter (Edmund Optics Inc.), no comprimento de onda de máxima emissão de cada dispositivo.

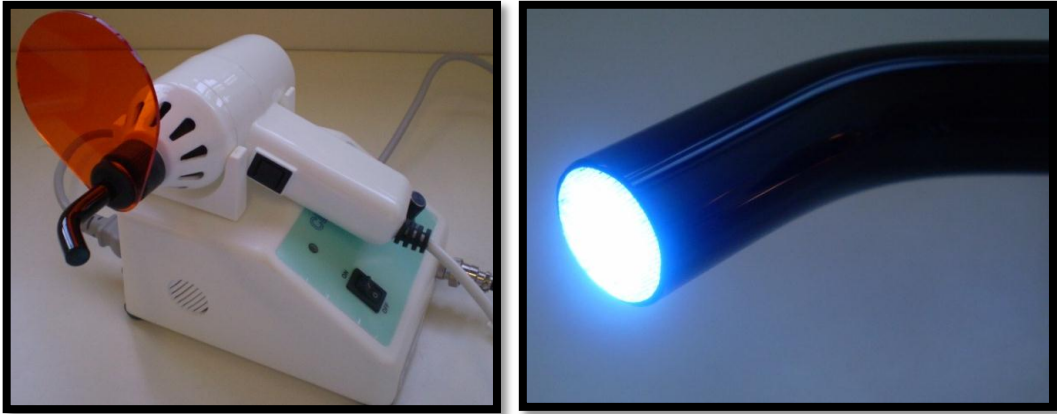


Figura 4. Luz halógena (Fotopolimerizador) de Resina Composta (Kondortech®) ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ).

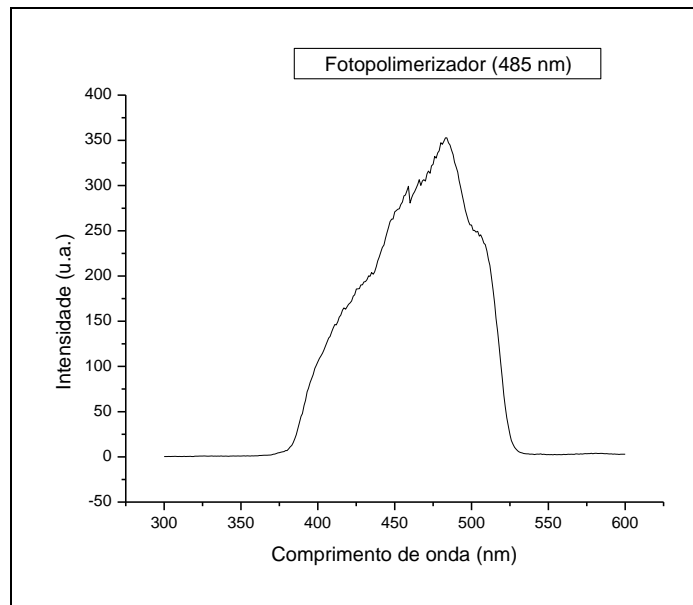


Figura 5. Espectro de emissão da luz halógena (Fotopolimerizador Kondortech®). ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ )

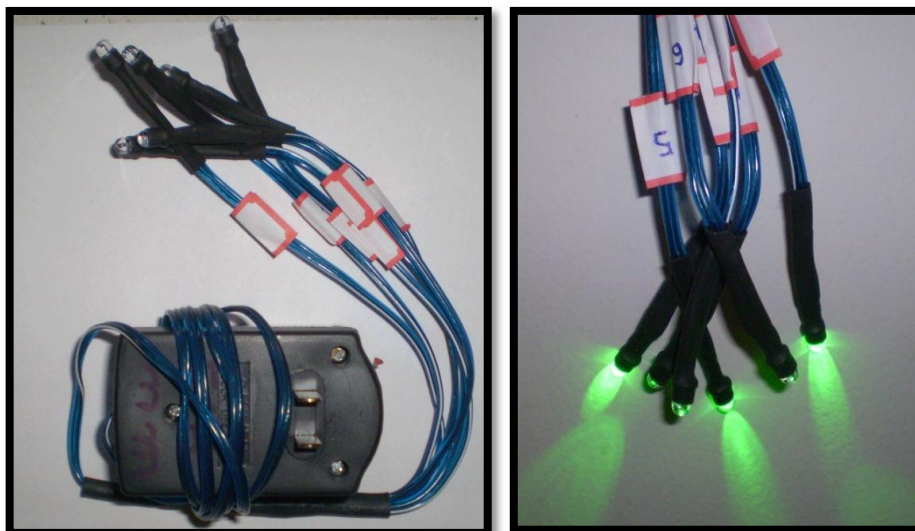


Figura 6. Dispositivo com seis LEDs verdes ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

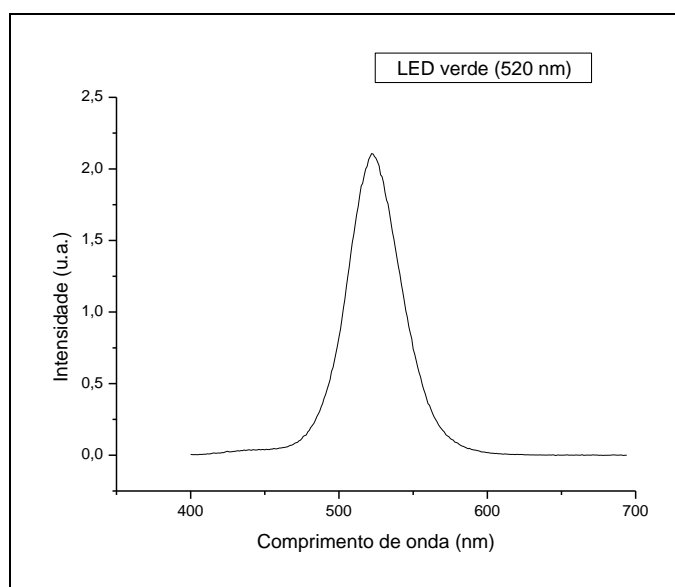


Figura 7. Espectro de emissão do LED verde ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

### 2.3. Ensaio da atividade fotodinâmica química - Teste do ácido úrico em solução aquosa

Para esta avaliação, utilizou-se como sensor químico o ácido úrico (AU), forte sequestrante de oxigênio singlete, sendo utilizado como um reagente para a

determinação química quantitativa da ação de fotossensibilização para TFD do tipo II (Maestrin et al., 2004). O AU apresenta uma banda com máximo de absorção em 293 nm e não absorve na região do visível (figura 8).

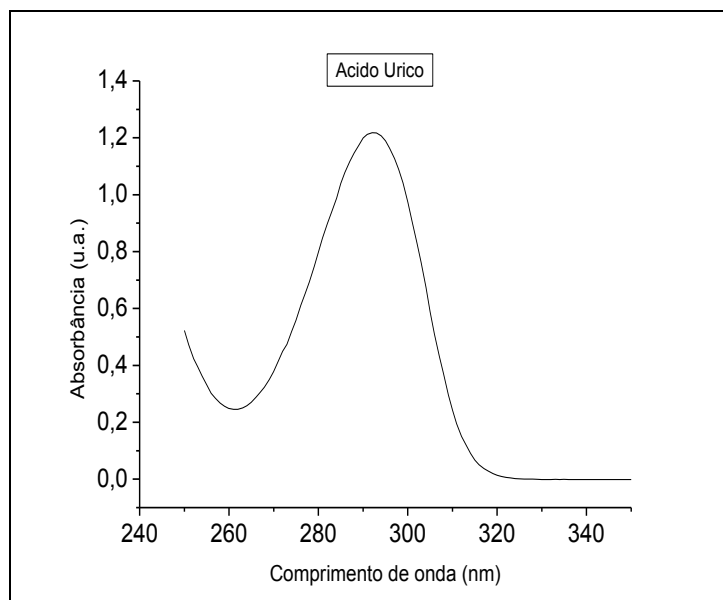


Figura 8. Espectro de absorção do Ácido Úrico ( $\lambda_{\text{máx}}=293$  nm).

Para os testes da eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador de resina composta, três concentrações do corante ( $1,13$ ;  $2,82$  e  $5,65 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) foram preparadas a partir da solução estoque ( $45 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em água destilada em uma solução contendo AU na concentração de  $1 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo de quatro faces (1,00 cm de caminho ótico), com a fonte de luz posicionada a 90° do caminho percorrido pelo feixe de luz do equipamento sob borbulhamento constante de ar. O fotopolimerizador foi mantido imóvel durante todas as leituras, sem interferência na distância e angulação com a cubeta do corante e mantido sob ventilação adicional (ventilador com fluxo direto sobre a fonte). Este sistema foi adaptado para iluminação da cubeta com o



fotossensibilizador pela luz halógena e conectado a um espectrofotômetro (Cary 50) que trabalha com radiação em fase, o que permite a incidência de radiações externas sem interferência nas medidas (figura 9).



Figura 9. Espectrofotômetro adaptado para as leituras da eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador sob ventilação adicional.

As leituras dos espectros de absorção eletrônicos foram registrados conforme a figura 10, monitorando a cinética de degradação do AU em 293 nm (comprimento de onda de máxima absorção). Esses espectros foram coletados em ciclos de 1,2 minutos, sendo que em cada ciclo sete espectros foram registrados, seis sob iluminação e um sem (espectros a cada 0,2 minuto). Passado esse tempo, um período de três minutos sem iluminação e sem leitura foi estabelecido para que a lâmpada pudesse esfriar. Estes ciclos foram feitos até que se observasse pouca variação no espectro. Além dos testes envolvendo a atividade fotodinâmica relacionada à produção de oxigênio singlete, espectros para avaliação do fotobranqueamento do corante, sem a presença do AU, nas três concentrações foram realizados para remover a interferência da degradação do corante nos cálculos do rendimento quântico dessa associação. Para a tabulação dos dados coletados, foram considerados apenas os períodos de leitura e os tempos de descanso foram desprezados.

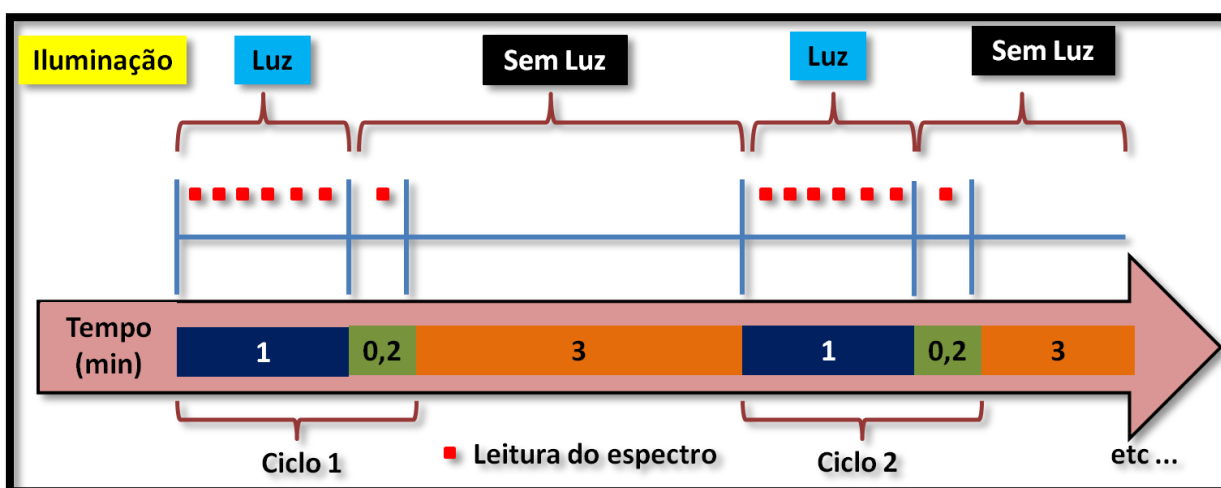


Figura 10. Ciclos de registros de espectro da solução contendo eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador ao longo do tempo.

Testes semelhantes para o monitoramento da degradação do AU e para avaliação do fotobranqueamento do corante também foram realizados para a eritrosina iluminada pelo LED verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ , 2,11 mW) para comparações. Três concentrações foram analisadas ( $1, 2 \text{ e } 5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ), com os LEDs posicionados a  $90^\circ$  do caminho percorrido pelo feixe de luz do equipamento sob borbulhamento constante de ar (figura 11). Neste, a fonte de luz permanecia ligada continuamente sendo que os espectros de absorção eletrônicos foram registrados periodicamente, com registros a cada 0,5 minuto nos primeiros 30 minutos; registros a cada 3 minutos nos próximos 90 minutos, registros a cada 5 minutos nos outros 180 minutos e por último, registros a cada 10 minutos até que se observasse pouca variação no espectro.

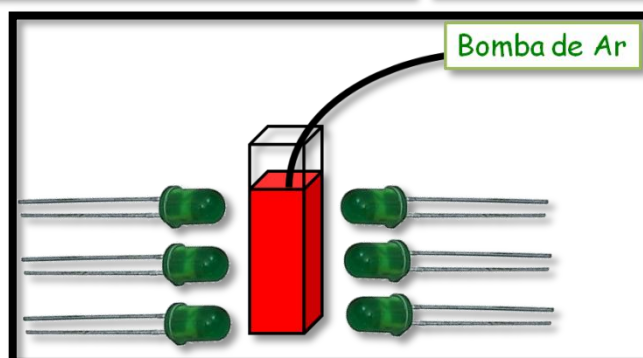
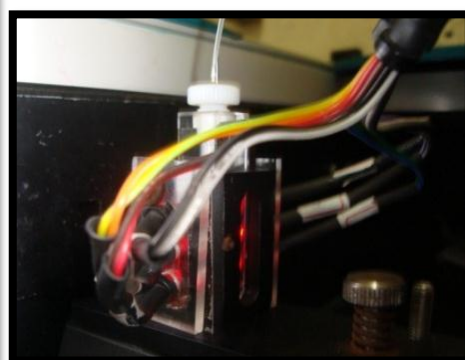
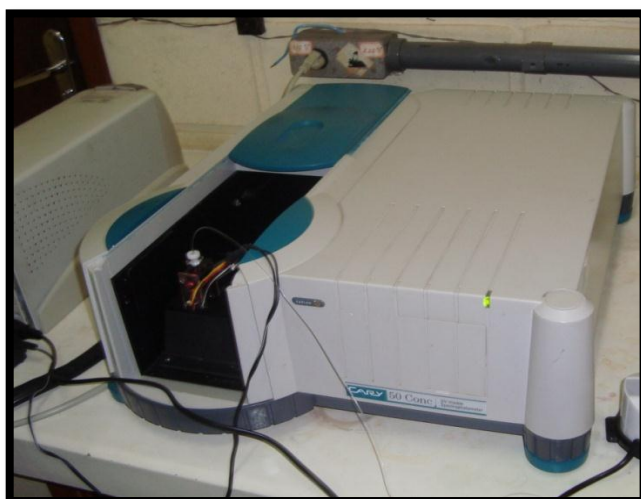


Figura 11. Espectrofotômetro utilizado para determinação indireta do rendimento quântico de oxigênio singlete, utilizando solução de eritrosina e sistema de LED verde.

Para expressar a eficiência de formação de oxigênio singlete, calculou-se o rendimento quântico ( $\Phi$ ) da amostra. Este é definido como o número de moléculas decompostas ou formadas em relação à quantidade de fótons absorvidos durante o processo (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Dessa forma, de acordo com equação desenvolvida pelo grupo de Química da UEM, alguns fatores devem ser considerados nesta quantificação, como a quantidade de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador, o mecanismo envolvido na foto-oxidação indireta do AU, a fotoestabilidade do fotossensibilizador, uma vez que reações de fotobranqueamento levam à diminuição da quantidade de fótons absorvidas com o tempo e a potência média das fontes de luz. (Gerola, 2010). Considerando esses fatores, a eficiência de formação de oxigênio singlete ( $Y_{\Delta}$ ) pode ser estimada pela equação 1, que relaciona a constante de velocidade da primeira etapa de degradação do AU, na qual há o envolvimento de  $^1O_2$ , *versus*  $N_{Abs}$ , determinando dessa forma, o coeficiente angular da relação linear referente ao valor de  $Y_{\Delta}$ , para a eritrosina. Esse valor pode ser usado na comparação da eficácia de diferentes fotossensibilizadores.

$$Y_{\Delta} \propto \frac{k_1}{N_{Abs}}$$

Equação 1. Eficiência de formação de oxigênio singlete ( $Y_{\Delta}$ ).

A partir do valor  $Y_{\Delta}$ , o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) foi calculado pela equação 2 usando Rosa de Bengala como substância padrão ( $\Phi_{\Delta}^{RB}$  e  $Y_{\Delta}^{RB}$ ).

$$\Phi_{\Delta}^{ER} = (\Phi_{\Delta}^{RB} / Y_{\Delta}^{RB}) Y_{\Delta}^{ER}$$

Equação 2. Rendimento quântico da Eritrosina ( $\Phi_{\Delta}^{ER}$ ).

## 2.4. Penetração de Eritrosina em Dentina

### 2.4.1. Amostra

Para avaliação da penetração do corante em dentina, dentes hígidos do banco de dentes da Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Maringá foram utilizados. Logo após a extração, os dentes foram imediatamente colocados em tubos contendo 5 mL de solução fisiológica 0,9% estéril e em seguida autoclavados a 121°C, por 20 minutos. Os dentes foram cortados em forma de bloco por um disco de diamante acoplado a um aparelho de corte (IsoMet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Os blocos foram confeccionados da seguinte forma: (1) corte para remoção da porção oclusal dos dentes a 2,5 mm da junção cimento-esmalte (2) corte a 1,4 mm de distância do primeiro em dentina; (3) cortes nas faces laterais mesial, distal, vestibular e lingual para remoção do esmalte; (4) utilização da politriz com lixa de granulação 600 para ajustes na espessura dos

blocos e para polimentos. Ao final, foram obtidos dois blocos com espessura de 1100  $\mu\text{m}$  e três blocos de 600  $\mu\text{m}$  de espessura. As medidas foram conferidas por meio da utilização de um paquímetro digital (Mitutoyo<sup>®</sup>).

Obtidos os blocos com as espessuras, marcações com esmalte de unha vermelho (Risqué<sup>®</sup> Luxúria) foram realizadas para determinar a face oclusal (com a marcação do esmalte sendo a face em que o corante seria posteriormente aplicado) e a face pulpar (face oposta, sem marcação com esmalte e que seria submetido a desgastes progressivos), tomando-se o cuidado para que esta marcação não interferisse nas leituras do sinal fotoacústico (figura 12). As amostras foram armazenadas em recipientes individuais contendo 5 mL de água destilada devidamente identificados.



Figura 12. Bloco de dentina com marcação de esmalte (face oclusal).

#### **2.4.2. Espectroscopia Fotoacústica (PAS)**

Para avaliação da profundidade de penetração do corante em dentina a técnica da espectroscopia fotoacústica foi utilizada. Esta técnica consiste na geração

de uma onda acústica, e pode ser observada quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de relaxação não radioativa. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma. Essa variação de pressão do gás é detectada pelo microfone que resulta no Sinal Fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente. A configuração da célula fotoacústica está representada na figura 13; ela consiste de uma amostra colocada dentro de uma célula, a uma distância da janela de vedação transparente, em contato de um lado pelo gás (ar) e do outro pelo suporte metálico, considerando que nem o ar nem o suporte absorvem a radiação incidente. Um microfone capacitivo é acoplado na parede lateral da célula em contato com o gás, o qual capta as variações de pressão do ar.

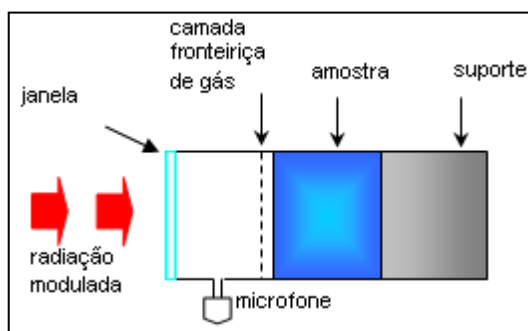


Figura 13. Representação da célula fotoacústica

A fração de luz, incidente na amostra, que for absorvida pelas moléculas pode ser convertida em calor. Este calor gerado pode chegar até a superfície da amostra e contribuir para o sinal fotoacústico, dependendo da profundidade do ponto de geração que é definido como a frequência de modulação da luz utilizada. Com esta

técnica, pode-se realizar separação espectral das contribuições dos diferentes constituintes das formulações que contribuirão para a absorção óptica descrita pelo espectro total do sistema. Além disso, o método é não destrutivo, porque permite que a amostra testada possa ser reutilizada para outros ensaios, quando não oxidada pela luz incidente.

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a realização dos experimentos está ilustrado na figura 14. Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel<sup>®</sup>, modelo 68820), com potência de 1000 W, e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. O monocromador (Oriel<sup>®</sup>, modelo 77250 (1/8 m) pode ter suas fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 mm ou 1,56 mm. A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico, (Stanford Research Systems<sup>®</sup>, modelo SR 540) que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador *Lock-in* (EG & G Instruments<sup>®</sup>, modelo 5110). Antes de passar pelo modulador de frequência, o feixe de luz passa ainda por filtros de banda larga para que sejam eliminadas ordens superiores de difração. As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de emissão da lâmpada. O microfone acoplado à célula fotoacústica (Brüel & Kjaer<sup>®</sup>, modelo BK 2669) está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o *Lock-in* (amplificador sincronizado), que fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB.



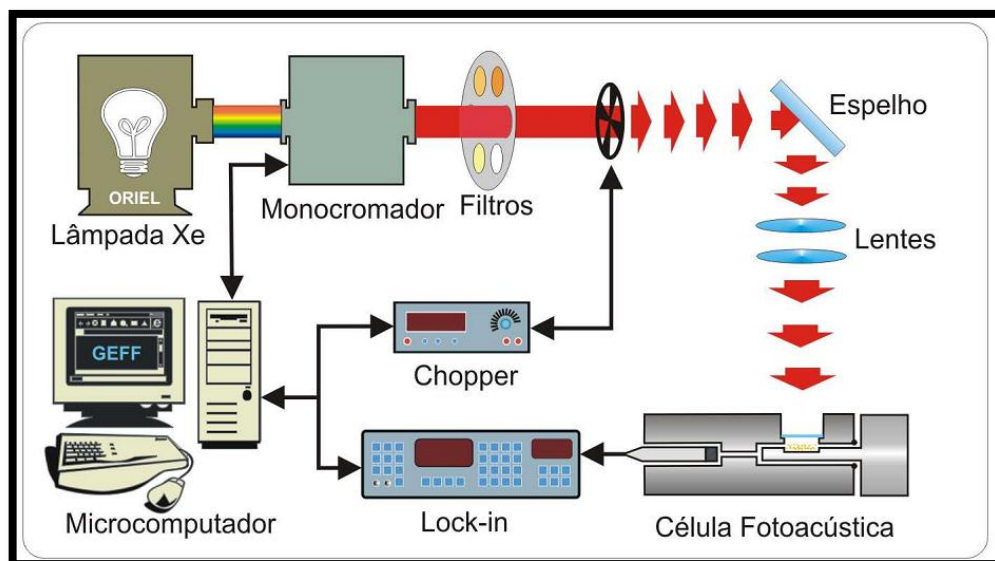


Figura 14. Espectrômetro Fotoacústico

Esse instrumento mede sinais da ordem de alguns nanovolts até um volt. Os sinais são obtidos em quadratura, de maneira que se obtém tanto a intensidade quanto a fase do sinal fotoacústico.

A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz é obtida a partir do sistema de aquisição de dados via interface GPIB em um microcomputador. Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal é então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

O sinal fotoacústico foi determinado por varredura de comprimento de onda e frequência fixa (variação de comprimento de onda de 300 a 800 nm e frequência fixa de 16 Hz). Primeiramente, estabeleceu-se varreduras via espectroscopia fotoacústica do bloco de dente sem aplicação do corante, o qual foi colocado na célula fotoacústica para leitura das duas faces do bloco.

Determinado o sinal fotoacústico do bloco, sobre a face oclusal, uma alíquota de 4  $\mu\text{L}$  da solução de Eritrosina  $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  foi colocada com pipeta

volumétrica e mantida por 30 minutos para permitir penetração (figura 15). Após este período, o excedente de corante foi removido com um cotonete e o bloco corado foi colocado na célula fotoacústica para leitura das duas faces. Primeiramente foi realizada leitura da face oclusal, em seguida da face oposta (pulpar) para detecção do corante. Quando o corante não fosse detectado nesta face, o bloco de dente seria lixado em granulação 1200 cuidadosamente para redução de sua espessura, e novas leituras na face pulpar seriam realizadas até o corante ser detectado.



Figura 15. Aplicação de Eritrosina na face oclusal (marcação com esmalte) antes e após período de 30 minutos.

Os dados foram tabulados em gráficos que ilustraram o sinal fotoacústico em relação ao comprimento de onda. O comportamento da permeação foi analisado pela integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras de dentina, com cálculo da estimativa da porcentagem de permeação da eritrosina.

## 2.5. Penetração da luz em dentina

Para esta avaliação, blocos de dentina (4 mm x 4 mm) em cinco espessuras diferentes foram confeccionados: 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mm. A análise se baseou na intensidade de luz transmitida após atravessar a amostra de dentina, mensurada por um potenciômetro (Power Meter, Coherent®). Para isso, um dispositivo de madeira de coloração preta (10 cm x 10 cm) com um orifício no centro de 2,0 mm de diâmetro foi confeccionado, de forma que sempre a mesma área fosse irradiada pelo fotopolimerizador. Primeiramente, essa intensidade da lâmpada sem os blocos de dentina foi submetida à leitura, com a saída da luz incidindo diretamente sobre o orifício. Depois, os blocos foram fixados neste dispositivo de forma que todo o orifício permanecesse vedado pelo bloco, quando então a lâmpada foi acionada permitindo as leituras para avaliar a intensidade de luz transmitida que alcançaria o sensor do potenciômetro (figura 16). A mesma distância da fonte de luz à amostra e da amostra ao potenciômetro foram mantidas para todas as leituras. As leituras foram repetidas três vezes e uma média destas foi estabelecida.

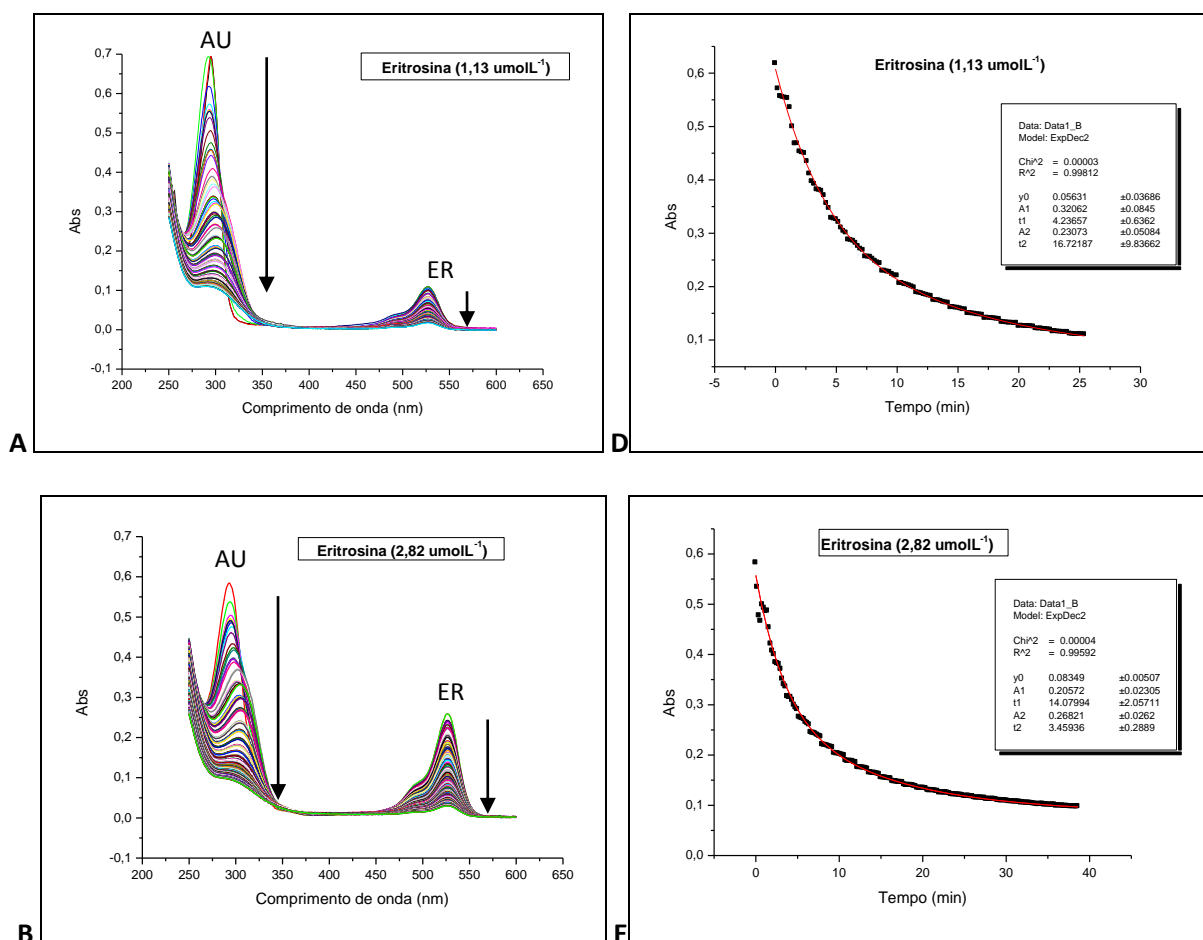


Figura 16. Avaliação da potência que atravessa blocos de dentina em Power Meter.

### 3. Resultados

### 3.1. Ensaios da atividade fotodinâmica química - Teste do ácido úrico em solução aquosa

A formação de oxigênio singlete pela excitação da eritrosina com fotopolimerizador de resinas compostas promoveu degradação do ácido úrico (AU), observada pelo decaimento em sua banda de absorção (figura 17). Observou-se também que as cinéticas de decomposição do AU geradas pelo monitoramento em 293 nm ajustaram-se ao modelo cinético de primeira ordem com duas etapas (figura 16), ou seja, trata-se de uma reação complexa de duas etapas consecutivas, aparentemente ambas de 1ª ordem, com formação de intermediário.



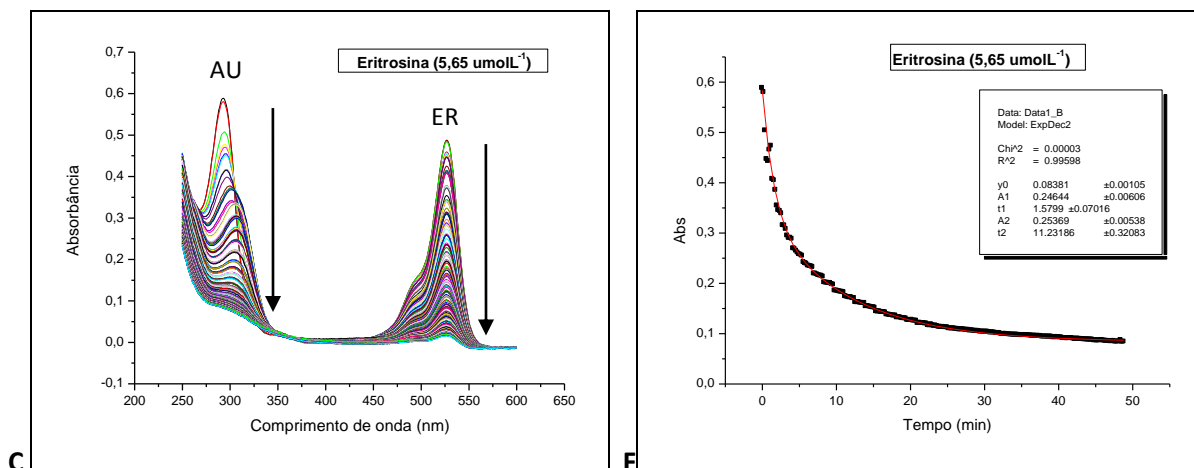


Figura 17. Variação espectral das soluções de eritrosina (A)  $1,13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ; (B)  $2,82 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e (C)  $5,65 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na presença de AU ( $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em água, com a irradiação de luz halógena (fotopolimerizador iluminação fracionada,  $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ); as setas indicam a degradação durante a iluminação. Cinética de degradação do ácido úrico nas três concentrações (D); (E) e (F).

Quando a eritrosina foi iluminada pelo LED verde, esta degradação também pode ser observada, com decaimento na absorbância do AU (figura 18).

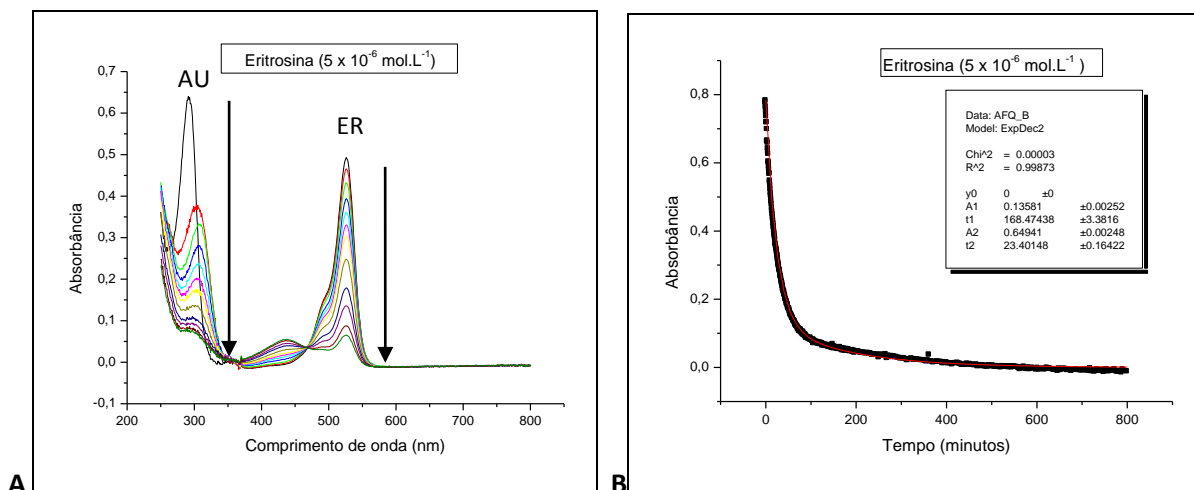


Figura 18. (A) Variação espectral da solução de eritrosina  $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  iluminada pelo LED verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$ ).

Assim, a eficiência de formação de oxigênio singlete pode ser calculada levando-se em consideração os valores da constante de velocidade da primeira etapa de degradação do AU ( $k_1$ ) e o número de fótons absorvidos  $N_{Abs}$  (tabela 6).

Tabela 6. Eficiência de formação de  $^1O_2$  ( $Y_\Delta$ ), calculada a partir dos valores das constantes de velocidade da primeira etapa de degradação do AU ( $k_1$ ) e da quantidade de fótons absorvidos em um intervalo de tempo ( $N_{Abs}$ ).

Eritrosina ( $10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ ) + Fotopolimerizador	$k_1$ ( $10^{-3}$ seg $^{-1}$ ) (293 nm)	$N_{Abs}$ ( $10^{-8}$ mol)	$Y_\Delta$ Eficiência de formação de $^1O_2$ ( $10^4$ seg $^{-1}$ mol $^{-1}$ )
1,13	390	3,86	
2,82	480	9,24	6,8
5,65	1050	12,99	
Eritrosina ( $10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ ) + LED verde			
1	0,71	1,29	
2	1,50	2,71	5,08
5	3,47	6,68	

A partir desses valores, o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_\Delta$ ) da eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador e pelo LED verde foram calculados, utilizando o corante Rosa de Bengala como padrão, por se tratar de um corante da mesma família da eritrosina (xantenos) (tabela 7).

Tabela 7. Eficiência de formação de  $^1O_2$ , rendimento quântico da literatura e calculado, utilizando Rosa Bengala como padrão.

Fotossensibilizador + Fonte de luz	$Y_{\Delta} \text{ } ^1\text{O}_2$ ( $10^4 \text{ seg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )	$\Phi_{\Delta} \text{ } ^1\text{O}_2$	$\Phi_{\Delta} \text{ } ^1\text{O}_2$ Literatura
Eritrosina + Fotopolimerizador	6,8	0,82	-
Eritrosina + LED Verde	5,08	0,63	0,63
Rosa de Bengala + LED Verde (padrão)	6,07	0,50	0,56

Foi observado que nos intervalos de tempo que a luz permanecia desligada (3 minutos) a reação continuava a acontecer, pois quando a lâmpada foi novamente acionada, e novas leituras foram realizadas, a absorvância do AU havia sofrido uma queda em seu valor (figura 19).

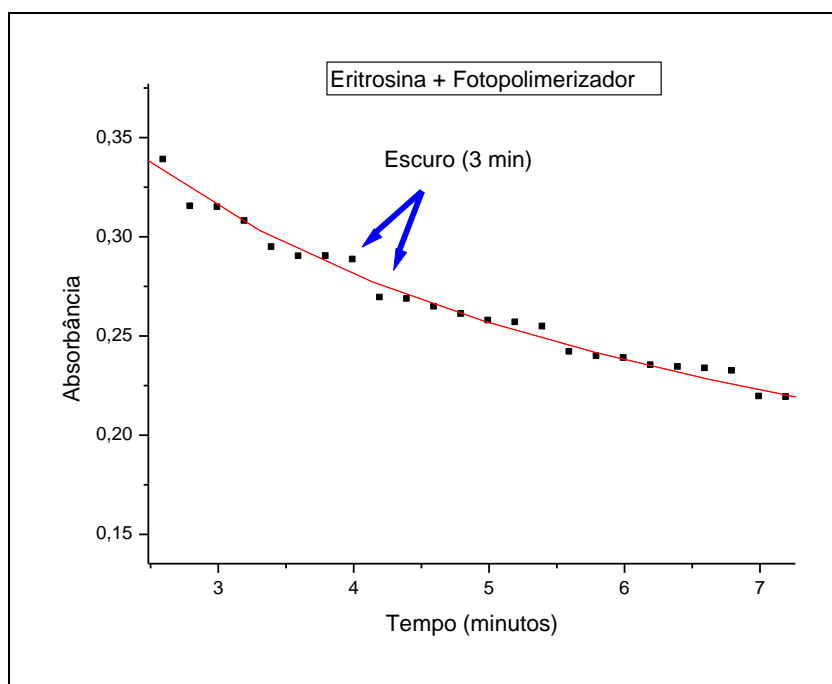


Figura 19. Cinética de degradação do AU mostrando a queda na absorbância mesmo sem iluminação com fotopolimerizador.

Uma estimativa da capacidade de formação de oxigênio singlete da eritrosina ( $5,65 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ), iluminada pelo fotopolimerizador em um minuto, foi feita pela porcentagem de AU degradado nesse intervalo de tempo, considerando o espectro no tempo zero como 100%. A porcentagem de degradação obtida foi de 24,17% para a solução iluminada pelo fotopolimerizador, enquanto para a solução iluminada pelo LED verde foi de 2,88% (tabela 8 e figura 20).

Tabela 8. Porcentagem de degradação de AU (proporcional à formação de  $^1\text{O}_2$ ) em um minuto da solução de eritrosina ( $5,65 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ) e pelo LED verde ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ).

Fonte de luz	Porcentagem de degradação de AU em 1 minuto
Fotopolimerizador	24,17%
LED Verde	2,88%

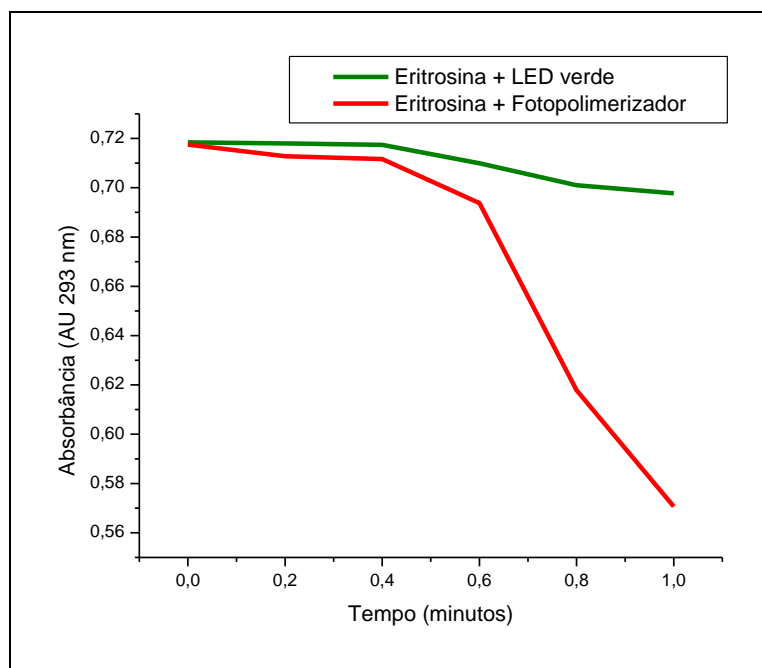


Figura 20. Cinética de degradação do AU em 1 minuto para a solução de eritrosina iluminada pelo LED verde e pelo fotopolimerizador.



Foi observada a ocorrência do fotobranqueamento do corante quando iluminado pelo fotopolimerizador, ilustrado pelo decaimento em sua absorbância. Esta reação de degradação do corante com e sem AU apresentou valores de constante de velocidade ( $k_1$ ) semelhantes ( $1,0 \times 10^{-3}$  e  $1,07 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$  respectivamente) (figura 21 e tabela 9).

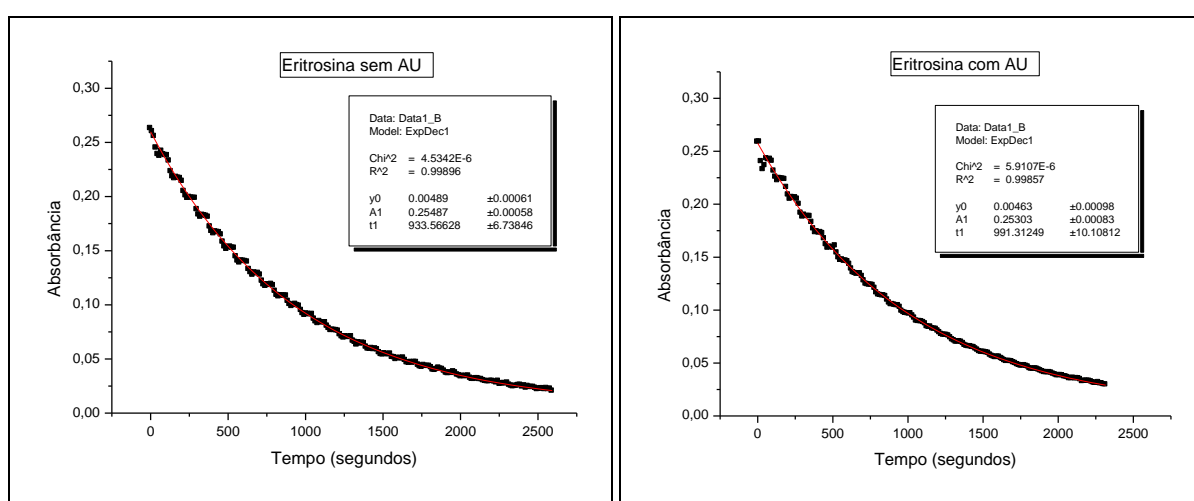


Figura 21. Cinética de degradação da eritrosina ( $2,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ).

Tabela 9. Constantes de velocidade de fotobranqueamento da eritrosina  $2,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , sob aeração constante, na presença e ausência de AU iluminada pelo fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}} = 485 \text{ nm}$ ).

FS ( $2,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )	$k_{\text{FB}} (10^{-3} \text{ seg}^{-1})$ sem AU	$k_{\text{FB}} (10^{-3} \text{ seg}^{-1})$ com AU
Eritrosina	1,00	1,07

### 3.2. Penetração de Eritrosina em Dentina

Num primeiro momento, dois blocos de dentina sem corante foram submetidos à leitura nas faces oclusal e pulpar, como controles. Notou-se que a banda de absorção dos blocos tanto na face oclusal como na face pulpar na região abaixo de 500 nm (figura 22).

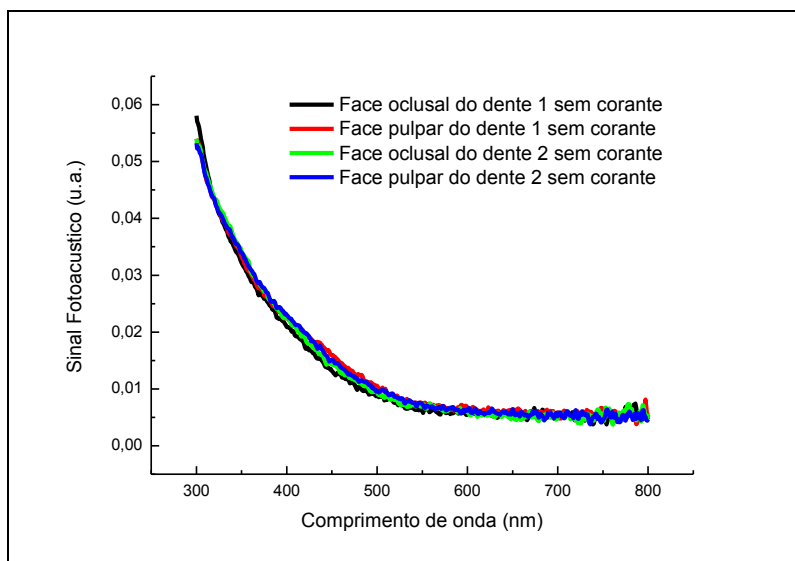
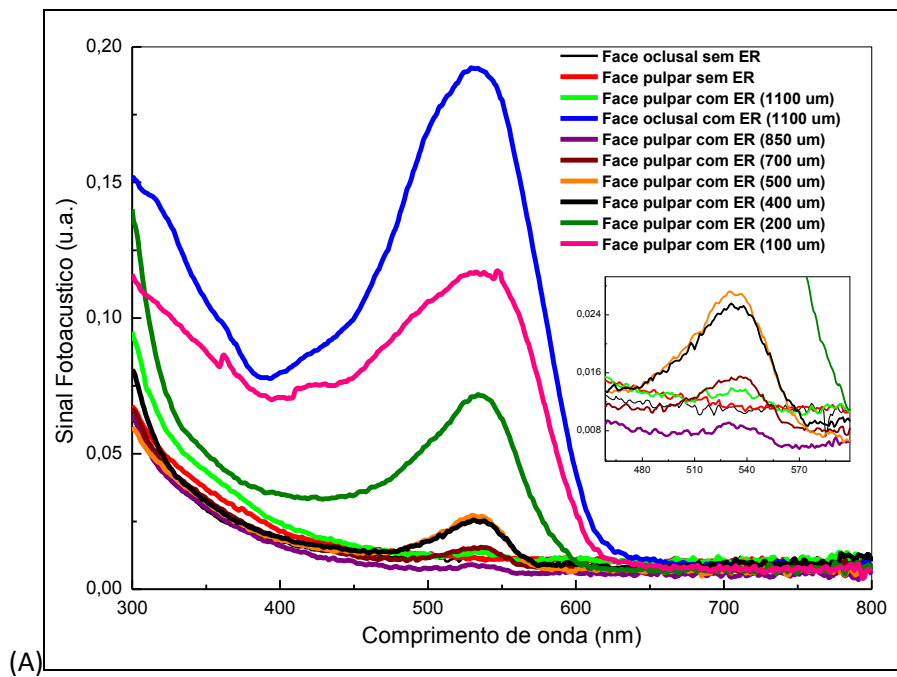


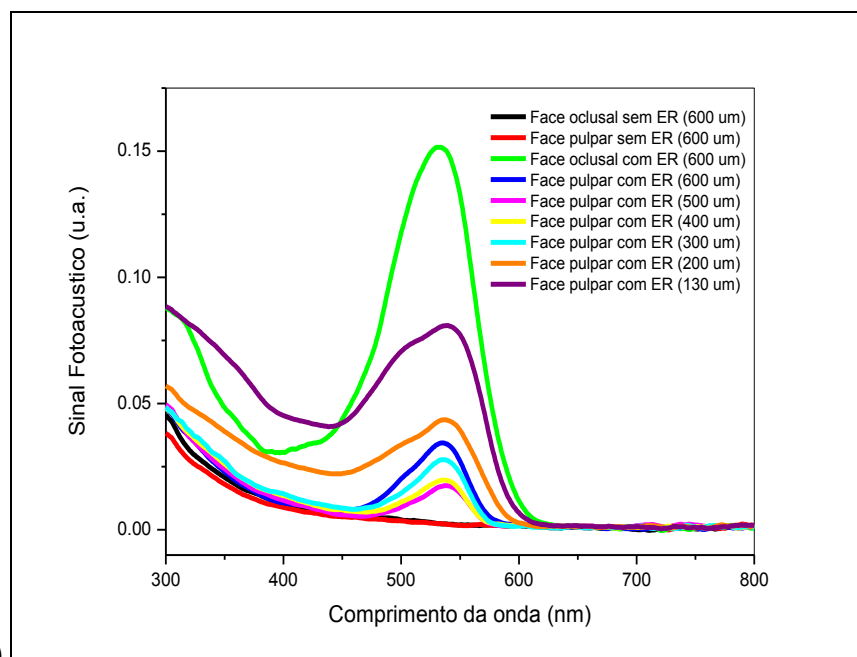
Figura 22. Sinais Fotoacústicos nas faces oclusal e pulpar do bloco de dente sem corante, considerado controle.

Nas leituras dos blocos de dentina experimentais, as linhas preta e vermelha correspondem ao sinal fotoacústico das faces oclusal e pulpar do dente não corado, respectivamente, nas espessuras iniciais. Foi observado para todos os blocos avaliados, que a solução de eritrosina apresentou banda de absorbância com centro em 526 nm. O primeiro e segundo blocos apresentaram espessuras iniciais de 1100  $\mu\text{m}$ , e os outros três, espessura de 600  $\mu\text{m}$ . No primeiro bloco, o corante passou a ser detectado a partir da espessura de 850  $\mu\text{m}$ , enquanto nos outros quatro, a partir de 600  $\mu\text{m}$  (linhas rosa) conforme mostrado na figura 23. Para melhor visualização, mostramos no detalhe de cada figura uma ampliação que comprova a presença do corante nestas respectivas profundidades já que a banda de absorção do mesmo,

em torno de 526 nm, foi detectada. Em todos os blocos, desgastes da face pulpar foram realizados para obtenção de diferentes espessuras, ilustradas pelas linhas amarela, azul clara, laranja, roxa e verde escura. À medida que a amostra foi lixada, esta se tornava mais fina e se aproximava da região de aplicação, dessa forma, a banda da eritrosina aumentou em função do desgaste da amostra.



(A)



(B)

Figura 23. Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação de eritrosina (ER) em dentina em diferentes espessuras, ilustrando penetração em 850  $\mu\text{m}$ , no bloco de 1100  $\mu\text{m}$  (A) e 600  $\mu\text{m}$  no bloco de 600  $\mu\text{m}$  (B).

O comportamento de permeação foi analisado pela integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras de dentina. Estes valores foram ajustados a uma equação exponencial que prevê a saturação dos valores do sinal fotoacústico de penetração da eritrosina em relação à espessura do bloco, dada por:

$$S(L) = Ae^{-L/\tau} + S_0$$

Equação 3. Equação teórica para estimar a quantidade de eritrosina em função da espessura da amostra.

em que  $S$  corresponde à área da banda de eritrosina em dentina,  $S_0$  e  $A$  são constantes de estágio de saturação e amplitude respectivamente, e  $\tau$  um parâmetro que pode estimar a porcentagem de eritrosina em uma determinada espessura do dente.

A partir dos valores de  $\tau$  encontrados para todos os blocos analisados, uma média foi estabelecida, como estimativa da porcentagem de eritrosina que penetra em uma determinada espessura de dentina. O valor médio encontrado para todos os blocos foi de 61  $\mu\text{m}$  (figura 24). Considerando este valor médio, independente da espessura inicial do bloco de dentina, sugere-se que aproximadamente 5% da

quantidade de eritrosina, somando também a quantidade presente na menor espessura analisada (100  $\mu\text{m}$ ) ( $L_1$ ) abaixo da superfície de aplicação ( $3\tau$ ), está presente em 283  $\mu\text{m}$ .

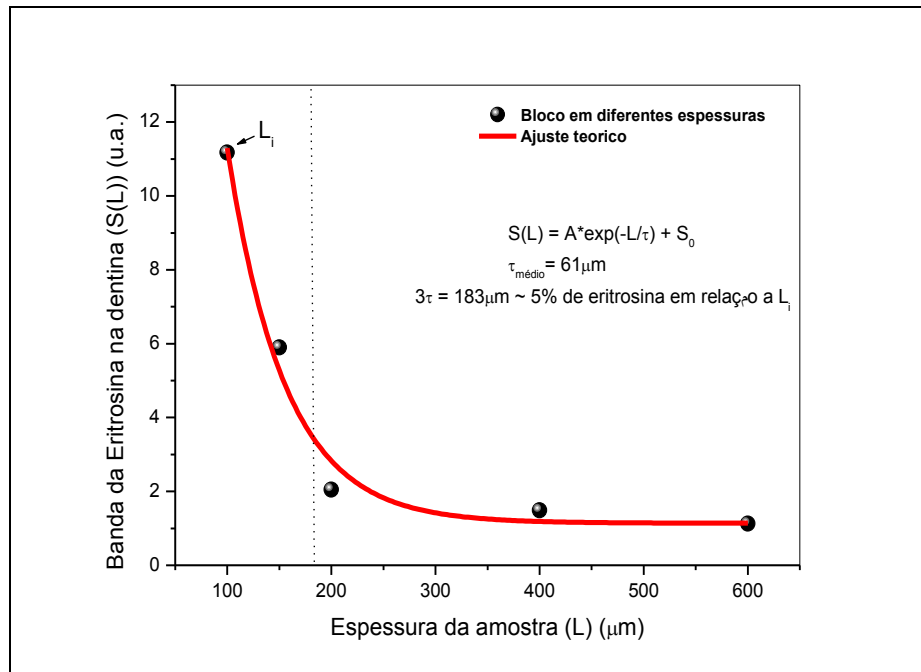


Figura 24. Estimativa da porcentagem de eritrosina que permeia em função da espessura da dentina. Média dos valores de  $\tau$  dos blocos, sugere presença de 5% da quantidade de eritrosina em 283  $\mu\text{m}$  em relação à espessura de 100  $\mu\text{m}$  ( $L_1$ ).

### 3.3. Penetração da luz em dentina

Observou-se que a leitura da potência da luz captada após o orifício foi de 190 mW. Com a presença dos blocos de dentina, notou-se que até a espessura de 2,5 mm, o medidor acusou leitura da potência de luz (tabela 10).

Tabela 10. Potência de luz captada pelo Power Meter que atravessou as diferentes espessuras de dentina.

<b>Espessuras (mm)</b>	<b>Potência (mW)</b>
<b>1,00</b>	1,3
<b>2,00</b>	0,8
<b>2,50</b>	0,4
<b>3,00</b>	0
<b>3,50</b>	0
<b>0 (controle sem dentina)</b>	190

#### **4. Discussão**

A aplicação da Terapia Fotodinâmica por meio da utilização de materiais presentes na rotina odontológica pode ser uma estratégia simples, viável, de baixo custo e promissora para a máxima conservação de estrutura dentária reforçando as vantagens para a inserção desse tratamento alternativo contra a cárie dentária. A associação de uma fonte de luz de uso clínico odontológico (fotopolimerizador) com um corante presente em alguns evidenciadores de biofilme dental (eritrosina) pode ser realizada considerando que o espectro de absorção do corante e a emissão da fonte de luz apresentam uma região de sobreposição (figura 25). Esta sobreposição demonstra que existe uma área de interseção entre corante e luz, apesar de não ser quase perfeita como ocorre com o LED verde (figura 25). Entretanto, considerando a disponibilidade do fotopolimerizador no consultório odontológico, facilitando o seu uso, assim como a maior potência que apresenta quando comparada ao LED verde, trouxeram o interesse nessa fonte de luz halógena como coadjuvante no processo

de geração de oxigênio singlete. Somado a isso, nenhum estudo havia quantificado a produção de oxigênio singlete dessa associação nem utilizado a técnica de espectroscopia fotoacústica para avaliar o comportamento de penetração da eritrosina em dentina. Assim como, não se sabia a profundidade de penetração dessa luz em dentina.

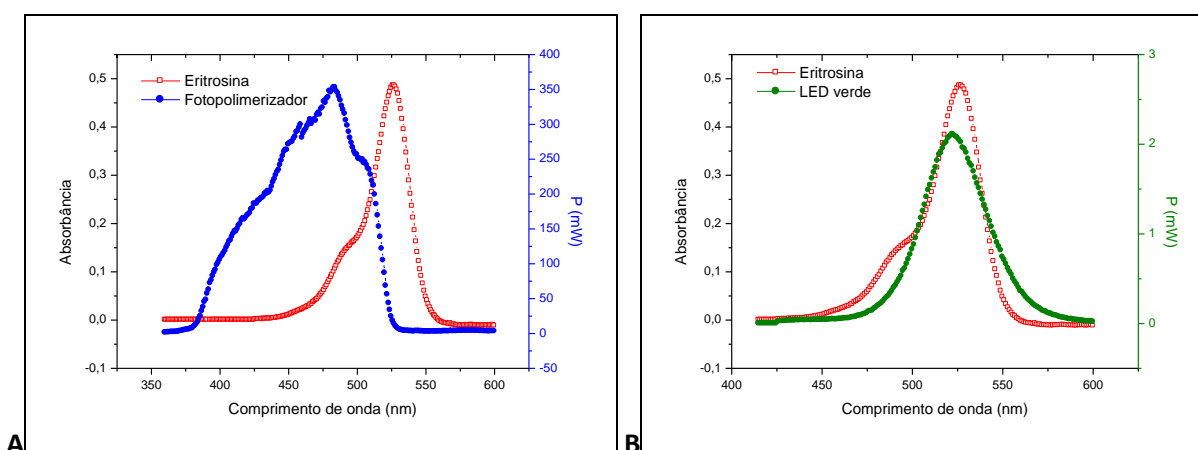


Figura 25. Sobreposição dos espectros de absorção da eritrosina com o fotopolimerizador ( $\lambda_{\text{máx}}= 485 \text{ nm}$ ) (A) e da eritrosina com o LED verde ( $\lambda_{\text{máx}}= 520 \text{ nm}$ ) (B).

Para avaliar a produção de oxigênio singlete, inúmeros métodos são utilizados, dentre eles tem-se a quantificação direta da fosforescência em 1270 nm, e a quantificação indireta pelo decaimento do estado triplete do  $\beta$ -caroteno. Contudo, essas medidas exigem equipamentos altamente sofisticados e caros que dificultam o uso da técnica (Wilkinson et al., 1993). Dessa forma, medidas no estado estacionário têm sido amplamente utilizadas como métodos alternativos pela oxidação de substratos específicos (sensor químico), que reagem prontamente com o oxigênio singlete (Gerola, 2010). A análise quantitativa dessas reações de foto-oxidação é monitorada pela variação da concentração do sensor químico e relacionada à quantidade formada de oxigênio singlete.

A formação de oxigênio singlete pela excitação da eritrosina com fotopolimerizador de resinas compostas e transferência de energia para o oxigênio molecular (mantido constante em solução pelo borbulhamento de ar) foi quantificada pelo método indireto, utilizando ácido úrico (AU) como sensor químico. Além de excelente captor de oxigênio singlete, o AU apresenta pequena sobreposição espectral em relação à eritrosina, uma vez que a absorção do AU ocorre em 293 nm e a da eritrosina a 526 nm, facilitando as análises posteriores, principalmente em relação ao fotobranqueamento. Além disso, o AU não absorve a radiação utilizada na fotoexcitação da eritrosina, ou seja, não é diretamente afetado pela luz, que emite num intervalo de 374 a 525 nm. Somado a isso, uma vez que o fotossensibilizador é excitado, este sofre o processo de conversão inter-sistemas atingindo o estado triplete que transfere energia para o oxigênio molecular presente na solução formando o  $^1\text{O}_2$ , que por sua vez reage com o ácido úrico. Esta degradação pode ser observada para a eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador e pelo LED verde, o que sugere a formação de oxigênio singlete comprovada pela diminuição na banda de absorção desse sensor químico. Quando essas duas formas de iluminação são comparadas, observou-se que o LED verde consumiu mais tempo para degradar o AU, possivelmente decorrente da diferença de potência entre as duas.

Havendo a produção de oxigênio singlete (evidenciada pela degradação do AU), o rendimento quântico foi calculado e este deveria apresentar valor semelhante ao da literatura para a eritrosina, ou seja, 0,63 (DeRosa e Crutchley, 2002). No entanto, encontrou-se para a eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador um valor diferente (0,82) mesmo com os ajustes que a equação utilizada permite realizar. Isso pode ser justificado pelas limitações na forma de iluminação, uma vez que a lâmpada após um minuto foi automaticamente desligada para evitar



sobreaquecimento. No intervalo de tempo que permanecia desligada (3 minutos) a reação continuava a acontecer, pois foi observado que quando a lâmpada foi novamente acionada e novas leituras do espectro foram realizadas, a absorvância do AU havia sofrido uma queda em seu valor. Esta queda ocorreu em todos os ciclos da reação (figura 19). Resultado diferente foi observado para a eritrosina iluminada pelo LED verde, uma vez que foi possível manter a iluminação de forma contínua, sem interferência de sobreaquecimento. Isso contribuiu para que o valor de rendimento quântico encontrado (0,63) fosse igual ao da literatura.

Considerando que essa associação de materiais odontológicos produziu oxigênio singlete, tornou-se importante calcular a porcentagem de degradação do AU proporcional à formação de oxigênio singlete, em um intervalo de tempo com aplicabilidade na prática clínica (um minuto). Foi observado que para a solução de eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador há uma porcentagem de 24,17% e para a solução iluminada pelo LED verde de 2,88%. Isso demonstra que para a solução iluminada pelo fotopolimerizador, neste intervalo de tempo, quase um quarto do ácido úrico já foi degradado, sugerindo que uma boa parte de  $^1\text{O}_2$  foi formado em apenas um minuto, provavelmente decorrente da maior potência do fotopolimerizador. Apesar desse fato contribuir ainda mais para mostrar as vantagens da utilização da eritrosina e do fotopolimerizador, mais estudos são necessários para avaliar se essa quantidade produzida é suficiente para gerar os efeitos terapêuticos desejados.

Outro fato interessante foi a ocorrência do fotobranqueamento do corante quando iluminado pelo fotopolimerizador, ilustrado pelo decaimento em sua absorvância. Esta reação de degradação do corante com e sem AU demonstrou que a presença de AU e de seus produtos não interferiram na velocidade de degradação

da eritrosina. Para Odontologia, este fotobranqueamento pode se mostrar vantajoso, pois a aplicação de corantes prejudicaria a estética e provocaria manchamentos na superfície dentária. Este efeito indesejado é eliminado considerando que a reação da eritrosina com a luz halógena promoveria o desaparecimento visual do corante que passaria a ficar incolor.

Em relação à avaliação da profundidade de penetração do corante pela técnica da espectroscopia fotoacústica, notou-se que a banda do sinal fotoacústico dos blocos tanto na face oclusal como na pulpar apresentaram-se semelhantes (pico próximo a 300 nm), viabilizando a comparação por esta técnica. A capacidade do corante de penetrar em dentina é uma propriedade importante pensando na atuação do fotossensibilizador sobre os microrganismos provenientes da cárie dentária nos túbulos dentinários. Na presente pesquisa, a profundidade de penetração da eritrosina em dentina nas condições experimentais, foi de 600 a 850  $\mu\text{m}$  no sentido ocluso-pulpar dos túbulos dentinários. Nas situações de invasão bacteriana de túbulos dentinários, dependendo da espécie, do tempo de exposição e do diâmetro dos túbulos, microrganismos podem estar presentes em até 500  $\mu\text{m}$  de distância de sua fonte de infecção (Haapasalo e Orstavik, 1987), sendo que para o gênero estreptococos, a invasão aos túbulos acontece em 200  $\mu\text{m}$  de profundidade (Love et al., 1997). Considerando isso, de acordo com o presente estudo, a eritrosina estaria presente nestas profundidades, podendo atuar sobre esses microrganismos. Além da eritrosina, outras substâncias podem atuar sobre microrganismos presentes nos túbulos dentinários como as medicações intracanáis e substâncias químicas conhecidamente eficazes como clorexidina, hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio (Orstavik e Haapasalo, 1990; Vahdaty et al., 2003; Cwikla et al., 2005; Lin et al., 2005; Retamozo et al., 2010). Entretanto, a ação dessas substâncias limita-se à

região mais superficial e que está em contato com a medicação, como no caso da pasta de hidróxido de cálcio que pode reduzir a viabilidade bacteriana a uma profundidade de até 200  $\mu\text{m}$  de dentina em sete dias (Cwikla et al., 2005; Lin et al., 2005). De forma semelhante, as soluções irrigadoras hipoclorito de sódio e clorexidina podem atuar a uma profundidade de 100 a 300  $\mu\text{m}$  nos túbulos dentinários (Vahdaty et al., 2003; Retamozo et al., 2010). Entretanto, apesar da profundidade de penetração da solução de eritrosina ter sido superior, mais estudos são necessários para avaliar a capacidade de inativação fotodinâmica da eritrosina que alcança essa profundidade e a penetração do corante nas situações de dentina cariada, nas quais o ambiente, a composição e organização da dentina encontram-se alterados.

Outro fato observado foi que para os blocos de 600  $\mu\text{m}$ , após aplicação do corante, o sinal fotoacústico da face pulpar nesta espessura apresentou-se maior que o sinal do bloco com espessura reduzida a 500  $\mu\text{m}$ . Nessa situação, o contrário deveria acontecer considerando que o sinal fotoacústico é proporcional à quantidade de corante, e na espessura maior (600  $\mu\text{m}$ ), uma quantidade menor deveria estar presente. Isso ocorreu pois observou-se que o corante depositava-se na face pulpar e quando o bloco foi manipulado para redução de sua espessura, o corante também foi removido e, conseqüentemente a intensidade do sinal na espessura de 500  $\mu\text{m}$  foi menor. Dessa forma, mais estudos poderiam ser realizados modificando a maneira com que as amostras foram manipuladas, assim como estudos com concentrações menores do corante.

Quando o comportamento de permeação foi analisado pela integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras de dentina, observou-se que sendo o sinal fotoacústico proporcional à absorção ótica do corante, à medida

que a espessura de dentina diminuiu, e aproximou-se da região de aplicação do fotossensibilizador, esse sinal de absorbância foi aumentado. Além disso, a absorbância do corante em profundidades maiores (600, 500, 400 e 300  $\mu\text{m}$ ) foi bastante semelhante, porém quando espessuras menores (200, 150, 130, 120 e 100  $\mu\text{m}$ ) foram analisadas, diferenças maiores nessa absorbância passaram a acontecer. A partir dessa observação, análises da estimativa de permeação do corante, ilustradas pelos valores de  $\tau$ , puderam ser realizadas por meio de um ajuste exponencial. Essas análises sugerem que em relação à quantidade de corante presente em 100  $\mu\text{m}$  ( $L_1$ ), em 183  $\mu\text{m}$  de espessura de dentina, há 5% de corante, de acordo com ajuste exponencial realizado. Porém, a espessura real na qual há 5% de eritrosina, deve ser acrescida de 100  $\mu\text{m}$ , que corresponde à menor profundidade na qual foi realizada leitura, obtendo-se dessa forma, a profundidade de 283  $\mu\text{m}$  como a espessura real a partir da qual há uma tendência com pouca variação do sinal fotoacústico, à medida que a espessura de dentina aumentava. O cálculo desta estimativa permitiu supor a quantidade aproximada de corante presente em espessuras diferentes, mesmo nas espessuras em que não foi realizada leitura.

Além da penetração do fotossensibilizador, a TFD requer que a fonte de luz alcance o corante para que este seja excitado e os efeitos terapêuticos desejados possam acontecer. Na avaliação da penetração da luz em dentina, observou-se que o fotopolimerizador apresentou permeação em dentina, com medida de potência mensurável até uma espessura de 2,5 mm. De acordo com as condições experimentais, esta profundidade alcançada pela luz do fotopolimerizador seria capaz de atuar sobre a eritrosina, que estaria presente entre 600 e 850  $\mu\text{m}$ . Apesar de alcançar esta profundidade, valores baixos de potência foram obtidos nas leituras. Isso pode ser explicado, pois sendo a estrutura dentinária não homogênea,

apresentando superfície com irregularidades e composição diversas, houve espalhamento da luz que alcançou o medidor de potência, não representando a quantidade de luz que poderia atuar no lado oposto. Parte disso também decorre da estrutura dentária apresentar absorção na região de emissão da fonte de luz, de acordo com espectroscopia fotoacústica do dente realizada sem a presença de corante. Com isso, mais estudos são necessários para se conhecer a potência e quantidade de luz que precisariam estar presente para que os produtos citotóxicos possam ser produzidos via TFD.

O fato da solução de eritrosina e do fotopolimerizador estudados produzirem  $^1\text{O}_2$ , e de apresentarem permeação em dentina reforçam o potencial desses agentes nos estudos de TFD contra microrganismos causadores de doenças bucais. Estes achados ajudam a justificar estudos da literatura que encontraram resultados positivos para a ação da eritrosina contra microrganismos. Nestes, observaram que a eritrosina ( $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) iluminada por um filamento de tungstênio (400 W, 500-550 nm) provocava maior inibição de biofilmes de *Streptococcus mutans* do que outros fotossensibilizadores como azul de metileno e Photofrin<sup>®</sup> (Wood et al., 2006; Metcalf et al., 2006). Há também estudo que avaliou a eficácia do fotopolimerizador ativando o fotossensibilizador rosa de bengala contra *Streptococcus mutans* (Paulino et al., 2005). Neste, observaram que a associação provocou morte bacteriana com a utilização de baixas concentrações do corante ( $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Além dos estudos com bactérias cariogênicas, resultados positivos também foram encontrados contra bactérias periodontopatogênicas (biofilmes e culturas planctônicas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) com a utilização da mesma associação eritrosina ( $2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) iluminada por fotopolimerizador (400-500 nm) (Goulart et al., 2010a). Observou-se que a eritrosina obteve melhor desempenho de inibição

que o azul de metileno com os mesmos tempos de exposição que variaram de 1 a 3 minutos. O mesmo grupo também estudou a efetividade da mesma fonte de luz (fotopolimerizador) associada ao corante rosa de bengala contra biofilme e culturas planctônicas de *A. actinomycetemcomitans* (Goulart et al., 2010b). Observaram que em baixas concentrações do fotossensibilizador (de 0,01 até  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) houve a inibição dos microrganismos e sem danos a fibroblastos gengivais nas mesmas condições. Os achados positivos destes estudos contra microrganismos podem estar relacionados aos resultados do presente estudo, uma vez que, o oxigênio singlete comprovadamente gerado por estes componentes é o principal agente responsável pelos efeitos terapêuticos da TFD.

A partir desses achados, mais estudos podem ser realizados avaliando a formação e interferência de intermediários na reação de degradação do AU e também investigações sobre a inativação fotodinâmica do corante e da fonte de luz em diferentes profundidades de dentina, na tentativa de melhor compreender os efeitos positivos encontrados dessa associação.

## **5. Conclusões**

Dentro das condições experimentais, a solução de eritrosina iluminada pelo fotopolimerizador de resinas compostas apresentaram resultados fotodinâmicos promissores. Houve produção de oxigênio singlete, com 24,17% de degradação de AU em um minuto, e rendimento quântico de 0,82. A eritrosina apresentou profundidade de penetração de 600 a 850 µm em dentina, e a luz do

fotopolimerizador mostrou penetração com potência mensurável até 2,5 mm de espessura de dentina.

## 6. Referências

ARAÚJO, P.V.; TEIXEIRA, K.I.; LANZA, L.D.; CORTES, M.E.; POLETTO, L.T. *In vitro* lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*. v.22, n.2, p.93-97, 2009.

BAPTISTA, A. Efeito da Terapia Fotodinâmica na doença cárie. Estudo *in vivo*. [Dissertação] Autarquia Associada à Universidade São Paulo – Lasers em Odontologia, 2009.

BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI JR, G.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic Therapy with Rose Bengal Induces GroEL Expression in *Streptococcus mutans*. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n.1, 2010.

CWIKLA, S.J.; BÉLANGER, M.; GIGUÈRE, S.; PROGULSKE-FOX, A.; VERTUCCI, F.J. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod*, v. 31, p. 50-52, 2005.

DAHL, T.A.; MIDDEN, W.R.; HARTMAN, P.E. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of bacteriology*. v. 171, n. 4, p. 2188-2194, 1989.

DEROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* v.233-234, p. 351-371, 2002.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* v.3, n.5, p. 380–387, 2003.

GEROLA, A.P. Estudos físico-químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoinativantes sobre micro-organismos. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2010.

GOULART, R.C.; THEDEI JR., G.; SOUZA, S.L.S.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*, v.28, p. S85-90, 2010a.

GOULART, R.C.; BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI JR., G.; SOUZA, S.L.S.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Photomed Laser Surg*, v.28, p. S53-60, 2010b.



GRANVILLE-GARCIA, A.F.; MENEZES, V.A.; ROCHA, M.R.S.; CAVALCANTI, A.L. Remoção químico-mecânica de tecido cariado: bases biológicas e materiais utilizados. *Stomatos*, v.15, n.28, p. 67-76, 2009.

HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*, v. 66, p. 1375-1379, 1987.

KIDD, E.A.M. How 'clean' must a cavity be before restoration? *Caries Res*, v.38, p; 305–313, 2004.

LIMA, J.P.M.; MELO, M.A.S.; BORGES, F.M.C.; TEIXEIRA, A.H.; STEINER-OLIVEIRA, C.; SANTOS, M.N.; RODRIGUES, L.K.A.; ZANIN, I.C.J. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* v.117, p.568–574, 2009.

LIN, S.; TSEH, I.; ZUKERMAN, O.; WEISS, E.I.; FUSS, Z. Effect of electrophoretically activated calcium hydroxide on bacterial viability in dentinal tubules – *in vitro*. *Dent Traumatol*. v.21, p.42–45, 2005.

LOVE, R.M.; MCMILLAN, M.D.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun*, v.65, p. 5157-5164, 1997.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAESTRIN, A. P. J.; TEDESCO, A. C.; NERI, C. R.; GANDINI, M. E. F.; SERRA, A. O.; IAMAMOTO, Y. SILVA, A.M.G.; TOMÉ, A.C.; NEVES, M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.15, n. 1, 2004.

MAISCH, T.; WAGNER, J.; PAPASTAMOU, V.; NERL, H.J.; HILLER, A.K.; SZEIMIES, R.M.; SCHMALZ, G. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.1569–1578, 2009.

METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erithrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 58, p.190-192, 2006.

MOURADIAN, W.E.; WERH, E.; CRALL, J. J. Disparities in children's oral health and access to dental care. *JAMA*, v. 284, n. 20, p. 2625-2631, 2000.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. v. 6, p. 142–149, 1990.

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

PETERSEN, P.E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S.; NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*. v. 83; n. 9, 2005.

PORTO, C.L.A.; PEREIRA, J.C.; NETTO, C.A. *Cariologia: grupo brasileiro de professores de dentística*. São Paulo, Artes Médicas, 2008.

RETAMOZO, B.; SHABAHANG, S.; JOHNSON, N.; APRECIO, R.M.; TORABINEJAD, M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 36, p. 520-523, 2010.

RICKETTS, D.; KIDD, E.; INNES, N.P.T.; CLARKSON, J.E. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.3, 2006. Disponível em <<http://www2.cochrane.org/reviews/en/ab003808.html>> Acesso em 13 jan. 2011.

ROHATGI-MUKHERJEE, K.K. *Fundamentals of photochemistry*, Wiley, New York, 1978.

SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. Dental caries. *Lancet*, v.369, p.51–59, 2007.

THOMPSON, V.; CRAIG, R.G.; CURRO, F. A.; GREEN, W.S.; SHIP, J.A. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review, *J Am Dent Assoc*, v.139, p.705-712, 2008.

VAHDATY, A.; PITT FORD, T.R.; WILSON, R.F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Dent Traumatol*, v.9, p. 243-248, 2003.

WILKINSON, F. W.; HELMAN, W. P. E ROSS, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1993, v. 22, p. 113–262.

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

WORMALD, R.; EVANS, J.R.; SMEETH, L.L.; HENSHAW, K.S. Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews* v.3, 2007.

ZANIN, I.C.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R.B. Terapia fotodinâmica na Odontologia. *RGO*, v.51, p. 179-182, 2003.

#### **IV – CONCLUSÕES**

Esta dissertação pode concluir que:

- Alguns fotossensibilizadores podem agir melhor contra bactérias Gram positivas ou negativas; que a máxima absorvância do corante deveria ser alcançada pela fonte de luz, e que alguns fotossensibilizadores podem ter sua absorvância modificada de acordo com a concentração empregada.
- A associação eritrosina e fotopolimerizador de resinas compostas produziu oxigênio singlete, com 24,17% de degradação do ácido úrico em um minuto e rendimento quântico de 0,82.
- A eritrosina apresentou penetração em dentina de 600 a 850  $\mu\text{m}$ , com 5% da quantidade total do corante em 283  $\mu\text{m}$ .
- O fotopolimerizador apresentou potência mensurável em até 2,5 mm de dentina.

## V - REFERÊNCIAS

ALLISON, R.R.; MOTA, H.C.; SIBATA, C.H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. *Photodiagn Photodyn Ther*, v.1, p.263-277, 2004.

ARAÚJO, P.V.; TEIXEIRA, K.I.; LANZA, L.D.; CORTES, M.E.; POLETTO, L.T. *In vitro* lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*. v.22, n.2, p.93-97, 2009.

BAPTISTA, A. Efeito da Terapia Fotodinâmica na doença cárie. Estudo *in vivo*. [Dissertação] Autarquia Associada à Universidade São Paulo – Lasers em Odontologia, 2009.

BEVILACQUA, I. M.; NICOLAU, R.A.; KHOURI, M.; BRUGNERA JR, A.; TEODORO, G. R.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M. T. T. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomedicine and Laser Surgery*. v. 25, n.6, p. 513-518, 2007.

BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI JR, G.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic Therapy with Rose Bengal Induces GroEL Expression in *Streptococcus mutans*. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n.1, 2010.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol*, Edinburgh, v. 38, n.6, p. 401-405, 1995.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. *Arch Oral Biol*, v. 37, n. 11, p. 883-887, 1992.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* v.3, n.5, p. 380–387, 2003.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.; WOOLFSON, A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth: design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*, v.86, p.59-69, 2007.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; Hamblin, M.R. Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 48, n. 6, p. 2173–2178, 2004.

GIUSTI, J. S. M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A.C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomedicine and Laser Surgery*.; v. 26, n.4, p.281-287, 2008.

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

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

LIMA, J.P.M.; MELO, M.A.S.; BORGES, F.M.C.; TEIXEIRA, A.H.; STEINER-OLIVEIRA, C.; SANTOS, M.N.; RODRIGUES, L.K.A.; ZANIN, I.C.J. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* v.117, p.568–574, 2009.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* v. 22, p. 83–91, 2007.

MAISCH, T.; WAGNER, J.; PAPASTAMOU, V.; NERL, H.J.; HILLER, A.K.; SZEIMIES, R.M.; SCHMALZ, G. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.1569–1578, 2009.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* v.79, p. 159-170, 2005.

METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erithrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 58, p.190-192, 2006.



MÜLLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P.R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci* v.115, p. 77–80, 2007.

O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagn Photodyn Ther* v. 2, p.247-262, 2005.

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

PERUSSI, J.R.; Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

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

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 Research*.; v.37, n.190-193, 2003.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*, v. 3, p. 412–418, 2004.

WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* v.53, p.61–109, 2008.

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

WORMALD, R.; EVANS, J.R.; SMEETH, L.L.; HENSHAW, K.S. Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews* v.3, 2007.

ZANIN, I. C. J. Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana do laser diodo associado a fotossensibilizador sobre microrganismos bucais. [Dissertação] Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 2002.

ZANIN, I.C.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R.B. Terapia fotodinâmica na Odontologia. *RGO*, v.51, p. 179-182, 2003.

ZANIN, J. C. I.; GONÇALVES, R. B.; BRUGNERA JR, A.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.56, p.324-330, 2005.

ZANIN, I. C. J.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K. A.; PIMENTA, L. A. F.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *European Journal of Oral Science*. v.114, p. 64-69, 2006.