





República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(11) **PI 0404223-9 B1**



(22) **Data de Depósito:** 28/02/2004

(45) **Data da Concessão:** 19/05/2015  
(RPI 2315)

---

**(54) Título:** USO DE AGENTES FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LUZ VISÍVEL ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

**(51) Int.CI.:** A61K6/00; A61N5/073; C09K11/06; C07D311/82

**(73) Titular(es):** Antonio Claudio Tedesco, Pietro Ciancaglini, Universidade de São Paulo - USP

**(72) Inventor(es):** Antônio Claudio Tedesco, Geraldo Thedei Júnior, Pietro Ciancaglini, Tony de Paiva Paulino

resultando na produção de ácidos orgânicos (Paulino e colaboradores, 2003 Biochemistry and Molecular Biology Education vol. 31; pp. 180-184.). Estes ácidos baixam o pH para valores em torno de 5,0 na superfície do dente induzindo assim sua desmineralização e causando a cárie.

5 Dentre alguns tipos de periodontites, a cárie dental, está inserida dentre as mais dignificantes doenças crônicas contagiosas as quais afetam primeiramente países subdesenvolvidos, populações de baixa renda e/ou pacientes imunocomprometidos. Já a existência da doença se baseia na interação de fatores que produzirão a destruição irreversível de estruturas mineralizadas do dente, podendo chegar a proporções de  
10 comprometimento da vitalidade dental e da fixação do elemento dental no complexo maxilo-mandibular.

Na ocorrência de cárie, algumas espécies de fungos e bactérias podem predominar. Dentre estas espécies, as bactérias *Streptococcus sobrinus* e o *S. mutans* compreendem uma parte substancial da contagem de células presentes na placa dental sujeita ao  
15 desenvolvimento de cárie e sua importância na etiologia da cárie dental é indiscutível, sendo o *S. mutans* o principal agente etiológico.

Assim, dentre os vários fatores que contribuem para a instalação e desenvolvimento da cárie, podemos citar: Hospedeiro: Hipoplasias de esmalte e dentina, alterações de posição do dente no arco dentário e carência de maturação pós-eruptiva;  
20 Dieta: Uma dieta carente de vitaminas, rica em carboidratos, irregular quanto ao aspecto de número, quantidade e qualidade de ingestões leva a alterações físico-químicas (pH, viscosidade, capacidade de tamponamento) do ambiente bucal, levando a destruição das superfícies mineralizadas dos dentes, facilitando a instalação de microorganismos que poderão levar ao desenvolvimento da cárie; Microbiota bucal: É normal a existência de  
25 uma microbiota na cavidade bucal, composta por várias espécies de bactérias, fungos e vírus; Tempo: A persistência das alterações da microbiota, no hospedeiro e na dieta, só poderá levar ao desenvolvimento da cárie desde que prevaleça por determinado período de tempo, variável de indivíduo para indivíduo.

A placa bacteriana é um biofilme composto por numerosos e distintos tipos de  
30 microorganismos em comunidades que vivem proximalmente justapostos a superfície do dente do hospedeiro ou a regiões adjacentes (gengiva).

O biofilme bucal (ou placa bacteriana) forma-se naturalmente no dente e sua presença é normalmente benéfica, pois contribui para estimular as defesas inatas do hospedeiro e consiste numa barreira contra outros microorganismos patogênicos. Assim,

de toluidina e azul de metileno ou alumínio ftalocianina dissulfonada.

Soukos e colaboradores (Lasers in Surgery and Medicine, 18: 253-259, 1996) mostraram que o azul de toluidina é citotóxico para *S. sobrinus* em concentrações ao redor de 5,0 µg/ml após irradiação com luz laser de baixa energia, enquanto que o tratamento similar não afetou a viabilidade de queratinócitos orais, sugerindo que o sistema de TFD pode ser empregado eficazmente no combate a bactérias causadoras de doenças periodontais. Nesse sentido, Wood e colaboradores (Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 50: 1-7, 1999) elaboraram um estudo *in vitro* para testar a TFD não em uma bactéria isolada, mas no ecossistema representado pelo biofilme dental, empregando para isso um sistema removível implantado no dente de voluntários que permita o estabelecimento de um biofilme. Após um tempo determinado, esse sistema era removido e submetido a TFD com ftalocianina. Os resultados mostrados por esses autores incluem a ocorrência de danos na membrana das bactérias e vacuolação do citoplasma, indicando que a TFD causou sérios danos para a estrutura bacteriana, sendo um potencial agente no combate a esses microrganismos.

O uso de corantes derivados de porfirinas e ftalocianinas tem sido comprovadamente eficientes no controle de microrganismos Gram positivos, dentre os quais está incluso o *Streptococcus mutans*.

O desenvolvimento da TFD voltado para a inativação de bactérias tem sido motivado pela observação do surgimento, nos últimos anos, de linhagens de bactérias altamente resistentes a antibióticos. Diversas investigações têm estabelecido que bactérias Gram positivas são sensíveis à ação de fotossensibilizante de uma ampla variedade de porfirinas e ftalocianinas. Por outro lado, bactérias Gram negativas possuem uma considerável resistência a fotossensibilização, a não ser que seja aumentada a permeabilidade de sua membrana externa pelo tratamento anterior com agentes químicos ou biológicos tais como CaCl<sub>2</sub> ou Tris-EDTA, por exemplo. A razão para a resistência de bactérias Gram negativas a fotossensibilização não é clara, mas pode estar relacionada com a carga do agente fotossensível. A maioria das drogas usadas na TFD, que são ineficientes contra estas bactérias, são neutras ou negativamente carregadas. Entretanto, estudos demonstraram que porfirinas e ftalocianinas positivamente carregadas induzem a fotossensibilização eficiente tanto de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas.

fonte de luz. A outra parte da suspensão bacteriana foi submetida ao experimento de morte celular com a adição de diferentes concentrações de Rose Bengal e doses de luz em diferentes tubos de ensaios (125 x 16 mm) protegidos da luz ambiente. Sob uma agitação branda, durante 10 minutos, foram incubadas as bactérias que posteriormente foram também irradiadas (12,8 mW) durante 30 segundos para as diferentes concentrações. O mesmo procedimento foi realizado com as bactérias submetidas à variação dos tempos de irradiação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 segundos) nos quais a concentração de Rose Bengal (0,5 µM) foi mantida constante.

Após estes tempos de irradiação, 50 microlitros da suspensão bacteriana (com ou sem bactérias tratadas com Rose Bengal) de todas as amostras (inclusive o controle) foram espalhados diretamente em placas de Petri contendo meio TSA, as placas foram protegidas da luz, colocadas em uma jarra de anaerobiose e incubadas a 37°C por 36 horas. Após este período de incubação, foi calculado o número de UFC's por mililitro de suspensão (UFC/ml).

Os resultados experimentais apresentados na Figura 3 demonstram a viabilidade de *S. mutans* na presença de Rose Bengal. A bactéria ( $10^3$  UFC), tratada com diferentes concentrações do corante foi pré-incubada sob agitação branda durante 10 minutos e posteriormente incubada para crescimento em meio de cultivo TSA durante 36 horas a 37°C, na ausência de luz. Apenas em concentrações acima de 5 µM houve toxicidade no escuro, "per se" (○) sendo que esta ordem de grandeza para a concentração de corante é normalmente encontrada em corantes fotossensíveis endógenos tais como a protoporfirina. Nas mesmas condições, a bactéria incubada com o Rose Bengal (0,5 µM) e irradiada pelo fotopolimerizador (●) (325.1 mJ/cm<sup>2</sup>) foi 100% inativada, não apresentando portanto, crescimento após incubação conforme descrito anteriormente. Assim, a grande diferença entre as concentrações do corante que causam a morte de *S. mutans* na presença (0,5 µM) ou ausência de luz (acima de 5 µM) indicam claramente que os compostos produzidos pela fotoativação de Rose Bengal são os responsáveis pela morte bacteriana.

Estudos demonstraram também que a morte celular induzida pelo tratamento com o Rose Bengal, seguido por irradiação de luz pelo fotopolimerizador (325,1 mJ/cm<sup>2</sup>), é dose (luz) dependente para *S. mutans* (Figura 4, (●)).

Portanto, para se avaliar a influência de diferentes intensidades de luz (Figura 4) a uma constante concentração de Rose Bengal (0,5 µM), a bactéria *Streptococcus*

outra parte da suspensão celular foi submetida ao experimento de irradiação com adição de diferentes concentrações de Rose Bengal (0 a 50  $\mu\text{M}$ ) em diferentes tubos (120 x 12 mm). Sob suave agitação as células foram incubadas por 10 minutos, assim como feito para o *S. mutans*, com subsequente irradiação (12,25 mW) com o fotopolimerizador durante 30 segundos (Figura 6, (■)) (0 a 40 segundos apenas em concentrações de 0,5  $\mu\text{M}$ , Figura 4 (■)). Após estes procedimentos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultivo DMEM/F-12.

Em seguida a cultura ressuspensa foi levada a uma incubadora de  $\text{CO}_2$  por um período de 24 horas e a viabilidade celular foi calculada em uma câmara de Neubauer baseada no teste de exclusão com Azul Tripán.

Assim, cepas de fibroblastos submetidas ao tratamento (com crescentes concentrações de Rose Bengal) foram avaliadas e, conforme se pode observar na Figura 6, apenas em concentrações superiores a 2,5  $\mu\text{M}$  houve um efeito de toxicidade, ao passo que, no escuro (□), foi observada toxicidade para concentrações superiores a 5,0  $\mu\text{M}$ .

Analisando a ação de diferentes doses de luz e Rose Bengal (0,5  $\mu\text{M}$ ) em células bucais (fibroblastos), observa-se que em com doses de luz abaixo de 433,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  a viabilidade dos fibroblastos (■) não foi afetada (Figura 4), sugerindo assim que a utilização da TFD com o Rose Bengal e o fotopolimerizador pode, após maiores estudos clínicos, ser empregado como um tratamento complementar aos tratamentos bactericidas convencionais.

Estes resultados revelam ainda que há a possibilidade de promover a inativação de microorganismos patogênicos via terapia fotodinâmica utilizando-se para isto um fotopolimerizador dental sem causar danos às células presentes nos tecidos adjacentes (fibroblastos).

FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LUZ VISÍVEL ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS” ora em questão, caracteriza-se como um processo terapêutico de grande utilidade, apresentando todas as  
5 qualidades práticas e de funcionalidade que justificam plenamente o pedido de Patente de Invenção.

Enquanto a presente solicitação foi descrita com referência à modalidade pretendida acima, será aparente aos versados na técnica e órgãos de controle que outras modificações na composição e detalhes de processo podem ser realizadas aqui, sem que  
10 se distancie do espírito e escopo do requerido, como fica bem definido na reivindicação anexa.

ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS", de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela disposição da solução aquosa salina contendo fármaco fotossensível dispostas sobre a periodontite ou região de acúmulo de microrganismos cariogênicos seguidos de irradiação com luz de comprimento de onda específica para ativação do agente fotossensibilizador, iniciar o processo de esterilização, sanificação ou destruição de microrganismos residentes..

7- "USO DE AGENTES FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LUZ VISÍVEL ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS", de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo uso do sistema de fotopolimerização com luz halógena ou sistema LED de irradiação na fluência total 10 a 550 mW na fluência total de 0.1 a 40 J/cm<sup>2</sup>, incidido diretamente sobre a lesão, cárie ou acúmulo de microrganismos por tempo determinado proporcional a área em tratamento e local da lesão.

8- "USO DE AGENTES FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LUZ VISÍVEL ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS", de acordo com a reivindicação 1, de uso tópico, caracterizada por uma formulação hidrogel ao qual é previamente associado o agente fotossensibilizador, derivados das famílias dos xantenos, porfirinas e ftalocianinas, denominada solução fotossensível .

9- "USO DE AGENTES FOTOSSENSÍVEIS ATIVADOS POR LUZ VISÍVEL ORIUNDA DE FOTOPOLIMERIZADORES OU SISTEMAS LED DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA NO TRATAMENTO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS", de acordo com a reivindicação 1, de uso tópico, caracterizado por uma formulação lipossomal ao qual é previamente associado o agente fotossensibilizador.