

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Gabriel Mariano Elias

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO E RADICAIS
SUPERÓXIDOS EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS
FOTOSSENSIBILIZADORES AZUL DE METILENO, EOSINA Y E
FLUORESCÉINA: Análise físico-química**

Diamantina

2021

Gabriel Mariano Elias

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO E RADICAIS
SUPERÓXIDOS EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS
FOTOSENSIBILIZADORES AZUL DE METILENO, EOSINA Y E
FLUORESCÉINA: Análise físico-química**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração em clínica odontológica - da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Galo
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Diamantina

2021

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

E42a

Elias, Gabriel Mariano

Avaliação da liberação de oxigênio singlete e radicais superóxidos em função de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores azul de metileno, eosina Y e fluoresceína: análise físico-química / Gabriel Mariano Elias, 2021.

56 p. : il.

Orientador: Rodrigo Galo

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2021.

1. Fotodinâmica. 2. Fotossensibilizadores. 3. Oxigênio singlete. I. Galo, Rodrigo. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 617.6

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

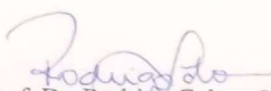
Gabriel Mariano Elias

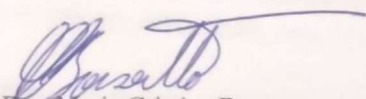
**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE E RADICAIS
SUPERÓXIDOS EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS
FOTOSENSIBILIZADORES AZUL DE METILENO, EOSINA Y E
FLUORESCÉINA: Análise físico-química**

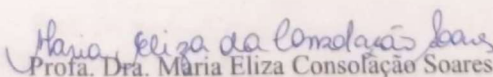
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração em clínica odontológica - da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Galo
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Data da Aprovação: 05/02/2021


Prof. Dr. Rodrigo Galo – Orientador
Programa de Pós-Graduação em Odontologia - UFVJM


Profa. Dra. Maria Cristina Borsato
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP


Profa. Dra. Maria Eliza Consolidação Soares
Programa de Pós-Graduação em Odontologia - UFVJM

Diamantina

DEDICATÓRIA

*“Ninguém tem maior amor do que aquele que dá a sua vida pelos seus amigos”
(João 15:53).*

Ao meu melhor amigo Jesus, sem sua graça e presença em minha vida eu nada poderia fazer!

Obrigado por teu amor que é único e incomparável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Galo, pela paciência, ensinamentos e orientação ao longo dessa pesquisa e durante minha graduação. Sua participação foi e será essencial durante toda minha formação profissional, obrigado por todo o carinho e amizade.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Guilherme Carneiro pelos direcionamentos e todo conhecimento transmitido principalmente durante a fase laboratorial. Sem você tudo seria mais difícil, foi um prazer conhecê-lo.

À Gislene Alessandra Santos, tão cuidadosa e dedicada em tudo o que se propõe a fazer. Você faz toda a diferença no PPGodonto. Um exemplo de caráter e profissionalismo.

Aos professores do PPGodonto por todo apoio e contribuições feitas durante minha formação.

Agradeço também a todos os colegas do PPGodonto pelo companheirismo ao longo dessa caminhada.

Agradeço ao PRPPG pela prestatividade em solucionar as questões burocráticas. Agradeço a toda a equipe técnica participante. Este estudo só foi possível graças à colaboração de todos vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS AFETIVOS

Agradeço aos meus pais Iara e Antônio, por todo amor e dedicação transmitidos durante toda minha vida. Vocês são meus exemplos!

Á Daniela, minha namorada, amiga e companheira. Obrigado por aguentar meus momentos de ansiedade e não me deixar desistir

Á minha avó Guaraciaba, pessoa iluminada e abençoada por Deus. Lamento todos os dias por não ter mais você ao meu lado.

Aos meus familiares por todo apoio, mesmo à distância. Em especial minha tia Maria Helena por todo o carinho e cuidados prestados desde o meu nascimento.

Agradeço aos meus amigos do QG do Imperador, amizades que conquistei em Diamantina que pretendo levar para minha vida toda.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy*- PDT) vem sendo utilizada em várias vertentes da Odontologia a fim de estabelecer protocolos eficientes de tratamento das mais diversas especialidades aos pacientes, em atendimento odontológico. É uma técnica que consiste na ativação de um agente fotossensibilizador (FS) que terá como produto espécies reativas de oxigênio, substâncias importantes para a ação antimicrobiana. Esta pesquisa teve como objetivo realizar ensaios laboratoriais com o propósito de mensurar a liberação de oxigênio singleto e radicais superóxidos em função de diferentes formulações e concentrações dos corantes azul de metileno (MB), eosina Y (EY) e fluoresceína (FL), bem como comparar a eficiência fotodinâmicas de FS fenotiazínicos (MB) e xantenos (FL e EY). Para tanto, foram analisadas soluções contendo estes compostos em meio ao solvente MIX glicerol, etanol e água) irradiadas com laser de baixa potência ($\lambda = 660 \text{ nm}$), e avaliadas fotometricamente quanto a produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), a qual foi determinada pela taxa de consumo do 1-3 difenilisobenzofurano (DPBF), substância sequestrante de $^1\text{O}_2$, em função da dose de irradiação. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS versão 22.0 por meio do teste ANOVA e teste complementar de Duncan ($p < 0,05$). Os dados demonstraram que o azul de metileno obteve uma maior atividade fotodinâmica por apresentar valores superiores quanto ao decréscimo do DPBF, com média de 89,9% e desvio-padrão de 1.8 em 150 μM , 87,6% e 2.9 para 15 μM e 77,3% e 2.5 em 1,5 μM . EY e FL obtiveram resultados semelhantes entre si não apresentando diferença significativa dentre as concentrações. Este estudo concluiu que o azul de metileno a uma concentração de 150 μM expressou uma maior produção de $^1\text{O}_2$, o que sugere um maior efeito antimicrobiano e destaca sua relevância quanto aos demais corantes.

Palavras-chave: fotodinâmica, fotossensibilizadores, oxigênio singleto.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (Photodynamic Therapy- PDT) has been researched in several aspects of Dentistry in order to establish efficient treatment protocols for the most diverse specialties to patients, in dental care. It is a technique that consists of activating a photosensitizing agent (FS) that will produce reactive oxygen species, substances that are important for antimicrobial action. This research aimed to carry out laboratory tests in order to measure the release of singlet oxygen and superoxide radicals according to different formulations and concentrations of the dyes methylene blue (MB), eosin Y (EY) and fluorescein (FL), as well as compare the photodynamic efficiency of phenothiazine (MB) and xanthene (FL and EY) FS. For this purpose, solutions containing these compounds were analyzed in the MIX solvent (glycerol, ethanol and water) irradiated with low power laser ($\lambda = 660$ nm), and evaluated photometrically for the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which was determined by the consumption rate 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF), a $^1\text{O}_2$ sequestering substance, depending on the irradiation dose. Statistical analyzes were performed using the SPSS version 22.0 program using the ANOVA and Duncan tests. Results with p values <0.05 were considered significant. The data demonstrated that methylene blue obtained a greater photodynamic activity as it presented higher values regarding the decrease in DPBF, with an average of 89.9% and standard deviation of 1.8 in 150 μM , 87.6% and 2.9 for 15 μM and 77.3% and 2.5 in 1.5 μM . EY and FL obtained similar results with no significant difference between concentrations. This study concluded that methylene blue at a concentration of 150 μM expressed a greater production of $^1\text{O}_2$, which suggests a greater antimicrobial effect and highlights its relevance in relation to other dyes.

Keyword: photodynamics, photosensitizers, singlet oxygen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema dos mecanismos da PDT

Figura 2 - Estrutura química dos corantes azul de metileno, eosina y e fluoresceína.

Figura 3 - LaserSmile em modo assistido de PDT

Figura 4 - Método de irradiação das soluções

Figura 5 - Consumo de DPBF em AM na diluição 10x

Figura 6 - Consumo de DPBF em EY na diluição 10x

Figura 7 - Consumo de DPBF em FL na diluição 10x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Levantamento de métodos utilizados em estudos com PDT no tratamento endodôntico.....	19
Tabela 2 – Dados estatísticos dos FS nas concentrações pesquisadas após a irradiação ..	33

LISTA DE ABREVIATURAS

DPBF	1-3 Difenillisobenzofurano
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EY	Eosina Y
FL	Fluoresceína
FS	Fotossensibilizadores
mL	Mililitro
Mn	Nanômetro
Mw	Megawatt
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
PDT	Terapia fotodinâmica (do termo em inglês: <i>Photodynamic Therapy</i>)
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
μL	Microlitro
μM	Micrômetro
μs	Microsegundo
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
Mecanismos de ação da PDT	13
Oxigênio singleto.....	14
Fotossensibilizadores.....	15
Importância do solvente na PDT	17
2. ARTIGO	19
<i>Title page</i>	20
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução	22
Objetivo.....	26
Materiais e métodos	27
Resultados.....	31
Discussão.....	34
Conclusão.....	37
Considerações finais.....	38
Referências.....	39
APAPÊNDICES	44

1 INTRODUÇÃO

Um pequeno número de compostos apresentam a capacidade de interagir com a luz a fim de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais apresentam alto poder antimicrobiano. Estas substâncias são denominadas fotossensibilizadores (FS), sua propriedade de ativação pela luz é conhecida como efeito fotodinâmico e sua ação pode ser aplicada em diversas áreas.

A técnica que utiliza o efeito fotodinâmico dos FS é denominada como terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy*- PDT) e têm apresentado resultados promissores no tratamento de infecções bacterianas localizadas e seu uso na odontologia (KOMERIK *et al*, 2003; MAISH *et al*, 2004). A infecção do canal radicular é causada principalmente por biofilmes bacterianos presentes no local (TRONSTADE e SUNDE, 2003). Como estabelecido, a desinfecção dos canais radiculares é feita através do preparo biomecânico em combinado com o uso de produtos químicos. (HAAPASSALO, UDNAES e ENDAL, 2003)

O sucesso da PDT, depende de fatores ambientais e microbiológicos do sítio alvo. Considerando a ampla gama de espécies bacterianas encontradas no canal radicular, a suscetibilidade à PDT está diretamente relacionada ao tipo de parede celular a ser acometida. (HAMBLIM e HASAN, 2004; GAD *et al* 2004) Desta maneira, torna-se necessária a busca por um protocolo ideal para que a PDT apresente sucesso quando utilizada na clínica odontológica.

Mecanismos de ação da PDT

A PDT é um tratamento realizado em duas etapas que envolvem a aplicação e retenção de um fotossensibilizador aplicado nos tecidos-alvo (SHARWANI *et al.* 2006), que é ativado pela exposição à luz visível aplicada por meio de um dispositivo em um comprimento de onda apropriado e diretamente direcionado ao alvo causando a excitação deste composto. Após a irradiação, o Fs passa pela transição do estado fundamental de baixo nível energético singleto para o estado tripleto de maior energia (DAI *et al.* 2009).

Existem dois mecanismos pelos quais, na presença de um substrato, como o oxigênio, a ativação do medicamento sensibilizador para o estado triplo pode entrar em reações químicas com biomoléculas (figura 1). As reações do tipo I levam à formação de radicais livres através da transferência de hidrogênio ou elétrons. Estes radicais, após a interação com o oxigênio, podem produzir espécies altamente reativas de oxigênio, como ânions peróxido ou superóxido, causando um efeito oxidativo e consequente danos à célula. (FOOTE 1991, KALKA *et al.* 2000). Nos mecanismos do tipo II, um estado de oxigênio eletricamente excitado e altamente reativo é liberado, denominado oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Como as reações do tipo II são mediadas por espécies singulares de oxigênio, isso é aceito como a principal via na destruição de células microbianas (DE ROSA e BENTLEY 2000, KONOPKA e GOSLINSKI 2007).

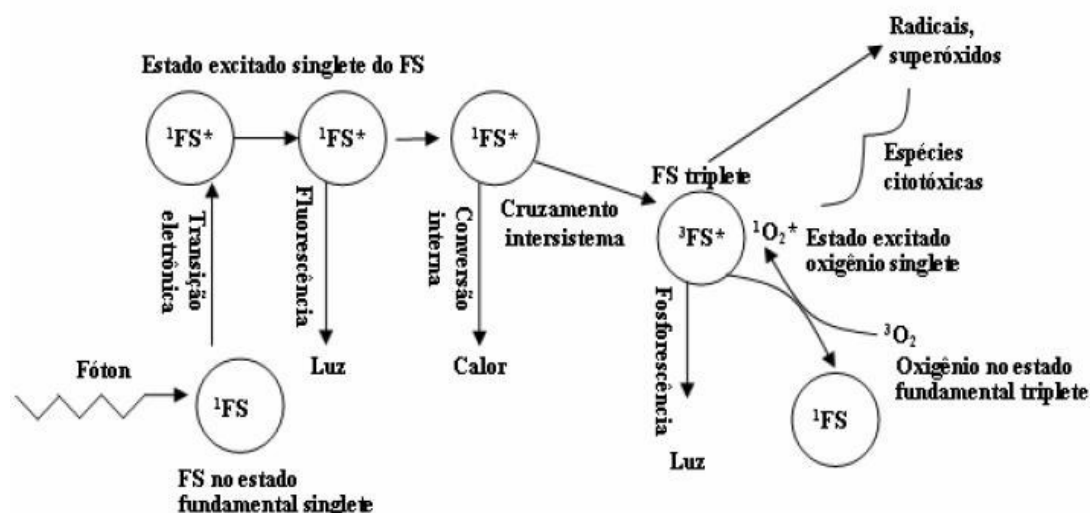


Figura 1. Esquema dos mecanismos da PDT (CASTANO, DEMIDOVA, HAMBLIN, 2004)

Embora esteja claro que o mecanismo tipo II é predominante e essencial na PDT e que o $^1\text{O}_2$ é o principal responsável pela morte celular, temos de destacar também a reação tipo I e seus radicais livres como importantes potencializadores ao efeito oxidativo que será causado ao sítio-alvo. A ocorrência de ambas as reações, dependem das taxas de interação FS-substrato e FS-oxigênio, tendo em vista que estes reagentes são competidores ao estado tripleto do corante. Sendo assim, a concentração de oxigênio e moléculas supressoras do substrato têm um papel fundamental na reação que irá ocorrer, após a correta irradiação e consequente excitação do FS.

Oxigênio Singleto

O $^1\text{O}_2$ representa um estado eletronicamente excitado do oxigênio molécula, seu efeito oxidativo pode danificar macromoléculas, incluindo lipídios, proteínas e ácido nucleico. A configuração eletrônica da molécula tem dois elétrons desaparelhados ocupando duas orbitais moleculares degeneradas. Estes orbitais classificam-se como antiligantes, pelo que a ligação OO em O_2 é mais fraca do que a ligação da molécula de NN em nitrogênio N_2 , onde todos os orbitais moleculares ligantes estão completos. (RONSEIN, et al; 2006)

Considera-se que, a maior parte dos FS utilizados na PDT, têm a formação de $^1\text{O}_2$ como principal função. Esta produção é a principal medida usada para medir a eficiência fotodinâmica através de cálculos de dosimetria direta que podem prever o resultado da terapia por meio da monitoração de formação de $^1\text{O}_2$.

A única Espécie reativa de oxigênio (ERO) representada por um estado eletronicamente excitado é o $^1\text{O}_2$, tendo como diferença entre as demais o tempo de vida e a forma de desativação. Ao retornar ao seu estado fundamental, ele perde sua reatividade, diferentemente das demais EROs que retêm sua reatividade até reagirem com outras moléculas, sendo assim, o $^1\text{O}_2$ apresenta um tempo de vida limitado mesmo em um sistema sem reagentes. Devido a sua alta reatividade, seu raio de ação é estimado de 0.01-0.02 μM , apresentando um tempo de vida de 0.01-0.04 μs em meios biológicos, o que deixa claro que o efeito fotodinâmico ocorre próximo a localização da molécula do FS no momento da irradiação (MACHADO, 2000; JUZENIENE, PENG e MOAN, 2007).

Desse modo, a formação e ação das ERO são processos alternados, onde a desativação de uma substância leva a formação de outra, até que o estresse oxidativo esteja estabelecido. A sobrevivência ou morte celular depende, principalmente, da capacidade antioxidante do meio, das defesas celulares que atuam neutralizando as ERO e da capacidade de reparo celular.

Fotossensibilizadores

O FS deve ser um composto puro com uma composição constante e um prazo de validade estável e, idealmente, solúvel em água ou solúvel em uma mistura de solventes aquosa inofensiva. Apresenta características específicas como: molécula cinética e termodinamicamente estável, não apresentar agregação em meio biológico, rápida síntese, ter baixos níveis de toxicidade no escuro e baixa incidência de toxicidade administrativa (CASTANO, DEMIDOVA, HAMBLIN, 2004)

Como a maioria das espécies microbianas não apresenta componentes fotossensíveis endógenos, torna-se importante o uso de um fotossensibilizador, com capacidade de atrair para si a luz e iniciar a formação de radicais livres. (DOBSON e WILSON, 1992). O efeito antimicrobiano do FS está relacionado com seu potencial de ação com o sítio-alvo. A literatura apresenta que bactérias Gram positivas apresentam diferentes suscetibilidades à PDT quando comparadas às bactérias Gram negativas (GERORGE; KISHEN, 2007). Esta diferença é explicada devido ao fato de a membrana plasmática de bactérias Gram positivas ser envolta por uma camada de peptidoglicanas e ácidos lipoteicoicos, o que favorece a penetração do FS ao interior destas células. Já nas bactérias Gram negativas, constitui-se em sua parede celular, peptidoglicanas e uma membrana externa composta por lipossacarídeos e proteínas, o que resulta em uma barreira física e funcional que dificulta a passagem do FS

para o meio celular. Contudo, as duas espécies apresentam carga superficial negativa, característica que leva os FS catiônicos a apresentarem maior potencial de ação quando comparados aos neutros ou carregados negativamente (KISHEN et al.; 2010).

Nesta circunstância, encontramos os compostos fenotiazínicos, classe de FS constituída de moléculas catiônicas, aromáticas, tricíclicas, que apresenta um sistema altamente conjugado. Estas características conferem a estes compostos propriedades como, absorção de luz na região entre 620-660 nm, espectro que permite maior penetração nos tecidos, e promove maior rendimento do oxigênio singlete (ALISSON, et al., 2005; MEISEL e KOCHER, 2005; BUCK, 2009).

Destaca-se como um dos corantes fenotiazínicos mais utilizado, o azul de metileno (MB), o qual apresenta características compatíveis para seu uso em PDT, como absorção máxima de 660 nm, considerável produção de oxigênio singlete e baixa toxicidade. (BALL *et al.* 1998, SEVERINO *et al.* 2003). Este composto possui em sua estrutura (Figura 2) três átomos de nitrogênio, um pode atuar reagindo com prótons e os demais estabilizam a molécula (BUCK, 2009). A carga positiva e sua geometria plana concedem ao MB a interação com a estrutura de DNA levando a uma ruptura da cadeia e degradação oxidativa através da ação do $^1\text{O}_2$. Apesar de ser comumente utilizado no tratamento contra o câncer, o MB também é eficaz no combate a vírus, bactérias e fungos (PERUSSI, 2007; HUSSAIN, HARRIS e PHOENIX, 2006; PHOENIX *et al.* 2003; WAINWRIGHT, 1997) e têm sido empregado no tratamento de patógenos presentes na cavidade oral

Os compostos xantenos, são corantes aniônicos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro. Alguns exemplos desta classe são a Eosina Y (EY) e a fluoresceína (FL) (figura 2).

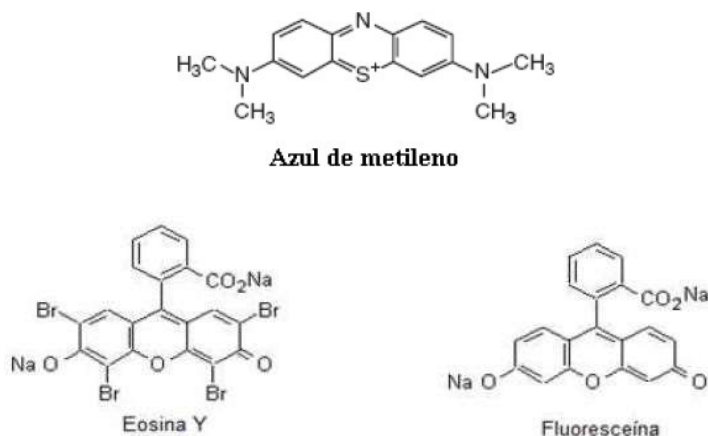


Figura 2. Estrutura química dos corantes azul de metileno, eosina y e fluoresceína. (HARRIS e PHOENIX, 2006; PHOENIX *et al.* 2003)

Estes corantes também apresentam algumas características que contemplam a PDT, como considerável produção de $^1\text{O}_2$, baixo custo e uma acentuada absorção de luz na região visível (500-570nm). Entretanto, este comprimento não é o adequado para a máxima penetração de luz nos tecidos, sendo estes corantes, mais indicados para o tratamento de lesões superficiais. (DIWU e LOWN, 1994; WANG *et al.* 2006)

Em virtude à alta fluorescência e baixa toxicidade, a FL vem sendo utilizada em doenças oftalmológicas atuando como um agente de visualização (WAINWRIGHT, 2003). A EY apresenta atividade fotodinâmica em bactérias e fungos (PERUSSI, 2007; WANG *et al.* 2006) e pode ser empregada na quantificação e coloração de citoplasma, colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio (GAO *et al.* 2007).

Importância do solvente na PDT

A eficácia da terapia está interligada com fatores como: a interação das moléculas fotossensíveis; o ambiente físico-químico do sítio-alvo; a meia vida dos radicais livres produzidos, e a disponibilidade de oxigênio no local a ser tratado. Todos esses fatores podem ser alterados de acordo com o solvente em que o FS é diluído.

Estudos anteriores demonstraram que a polaridade e viscosidade do solvente podem influenciar nas propriedades fotofísicas do FS (PARSEK E SINGH, 2003). Em solventes apolares $^1\text{O}_2$ tem um considerável tempo de meia vida mais longo. (MEISEL e KOCHER, 2005). Vários estudos foram feitos a fim de combater a infecção bacteriana localizada bem

como seus efeitos colaterais, porém pouco é encontrado quanto a tentativa de proporcionar uma maior eficácia a PDT modificando o solvente do FS. (GEORGE e KISHEN, 2008).

A quantidade de dímeros formados atuam modulando as características fotoquímicas e fotofísicas do MB, competindo pelo estado tripleto no FS, tanto nas transferências eletrônicas (FS- substrato), quanto nas transferências de energia (FS-oxigênio). A captação de energia através das moléculas de dímero apresentam pouca efetividade (PATIL e TALAP, 2002), sendo mais presentes nas reações que envolvem trocas eletrônicas (reação tipo I), com baixa produção de $^1\text{O}_2$ (reação tipo II). Portanto, tendo em vista o $^1\text{O}_2$ como principal substância da PDT, é preferível uma formulação que estabilize a porção monomérica. (GEORGE e KISHEN 2007)

Devido a pequena distância de difusão do $^1\text{O}_2$ (20nm) e sua curta meia vida de duração, o FS deve estar em íntimo contato com o sítio-alvo para que se obtenha um efeito antimicrobiano eficaz (MEISEL e KOCHER, 2005). Desta forma, o solvente utilizado na formulação pode atuar alterando essas características, sendo a meia-vida do $^1\text{O}_2$ consideravelmente maior em etanol (20 μs) do que em água (4 μs) (MEISEL e KOCHER, 2005).

De modo geral, os resultados antibacterianos da PDT são limitados comparativamente aos resultados do preparo biomecânico. No entanto, esta tecnologia tem instigado a busca de aprimoramento através da pesquisa por diferentes protocolos de execução bem como o estudo por diferentes classes de Fs, suas concentrações, solvente utilizado e fontes de irradiações empregadas. (Tabela 1)

Tabela 1. Levantamento de métodos utilizados em estudos com PDT no tratamento endodôntico.

Autores	Fotossensibilizador	Faixa de concentração	Solvente utilizado	Parâmetros de laser	Dispositivo de entrega
Bergmans <i>et al.</i> (2008)	Azul de toluidina	12.7 mg/mL ⁻¹		E=15J, P=100mW, λ =635nm, T=150s	Fibra óptica 300 μ m
Fimple <i>et al.</i> (2008)	Azul de metileno	25g/ml (67 mol/l)	Caldo infusão cérebro coração e solução salina tamponada com fosfato	F=30J/cm ² , IP=100mW/cm ² , λ =665nm, OP=1W	Fibra óptica 600 μ m
Fonseca <i>et al.</i> (2008)	Azul de Toluidina	0.0125%	Água	E=6,4J, λ =660nm, OP=50mW	Fibra óptica 500 μ m
Garcez <i>et al.</i> (2007)	Polietilenimina de cloro (e6)		Polietilenimina dissolvido em dimetil-sulfóxido + clorina + 1-etil-3-(3-dimetilaminopropiol) + trietilamina	F=40J/cm ² λ =660nm, P=40mW	Fibra óptica 200- μ m
Garcez <i>et al.</i> (2006)	Azuleno	25%	Peróxido de ureia 10% + detergente 25% e carbowax 75%	1.8J/cm ² , T=180s, λ =685nm, P=10mW	Fibra óptica 365 μ m
Foschi <i>et al.</i> (2007)	Azul de metileno	6.25 mg/mL(16,73 μ M)	Solução salina tamponada com fosfato	F=60J/cm ² , λ =665nm, OP=1000mWatt	Fibra óptica 500 μ m
Pagonis <i>et al.</i> (2011)	Azul de metileno	50 mg/mL	Solução salina tamponada com fosfato	E=30J/cm ² , T: 300s, IP=100mW/cm ² , λ =665nm, OP=1W	Fibra óptica 250 μ m
Rios <i>et al.</i> (2011)	Azul toluidina	0,25 ml		LED, T= 30s	Ponteira do LED
Soukos <i>et al.</i> (2006)	Azul de metileno	25 mg/ ml – 50mg/ml	Solução salina tamponada com fosfato	F=222J/cm ² , IP=740mW/cm ² , λ =665nm, OP: 1000mW	Fibra óptica 500 μ m
Souza <i>et al.</i> (2010)	Azul de metileno 15 μ mg/mL	2mmol/l	Caldo infusão cérebro coração	F=60J/cm ² , λ =665nm, OP=1W	Fibra óptica 500 μ m
Vaziri <i>et al.</i> (2012)	Azul de toluidina	15 mg/ml		E=12J, λ =625nm, IP=20mW/cm ²	-

2 – ARTIGO

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Clinical Oral Investigations*

Fator de impacto: 2,453

ARTIGO

Otimização da liberação de oxigênio singlete e radicais superóxidos em função de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores azul de metileno, eosina Y e fluoresceína: análise físico-química

Gabriel Mariano Elias¹, Guilherme Carneiro² e Rodrigo Galo³

¹Departamento de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

³Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Corresponding author:

Gabriel Mariano Elias
Rua da Glória, 187, Centro
Diamantina, Minas Gerais - Brazil
CEP: 39100.000
Phone: +55 (38) 3532 6000
Email: gabriel-jkm@hotmail.com

RESUMO

A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy*- PDT) vem sendo pesquisada em várias vertentes da Odontologia a fim de estabelecer protocolos eficientes de tratamento das mais diversas especialidades aos pacientes, em atendimento odontológico. É uma técnica que consiste na ativação de um agente fotossensibilizador (FS) que terá como produto espécies reativas de oxigênio, substâncias importantes para a ação antimicrobiana. Esta pesquisa teve como objetivo realizar ensaios laboratoriais com o propósito de mensurar a liberação de oxigênio singleto e radicais superóxidos em função de diferentes formulações e concentrações dos corantes azul de metileno (MB), eosina Y (EY) e fluoresceína (FL), bem como comparar a eficiência fotodinâmicas de FS fenotiazínicos (MB) e xantenos (FL e EY). Para tanto, foram analisadas soluções contendo estes compostos em meio ao solvente MIX glicerol, etanol e água) irradiadas com laser de baixa potência ($\lambda = 660 \text{ nm}$), e avaliadas fotometricamente quanto a produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), a qual foi determinada pela taxa de consumo do 1-3 difenilisobenzofurano (DPBF), substância sequestrante de $^1\text{O}_2$, em função da dose de irradiação. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS versão 22.0 através do teste ANOVA e teste complementar de Duncan. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados demonstraram que o azul de metileno obteve uma maior atividade fotodinâmica por apresentar valores superiores quanto ao decréscimo do DPBF, com média de 89,9% e desvio-padrão de 1.8 em 150 μM , 87,6% e 2.9 para 15 μM e 77,3% e 2.5 em 1,5 μM . EY e FL obtiveram resultados semelhantes entre si não apresentando diferença significativa dentre as concentrações. Este estudo concluiu que o azul de metileno a uma concentração de 150 μM expressou uma maior produção de $^1\text{O}_2$, o que sugere um maior efeito antimicrobiano e destaca sua relevância quanto aos demais corantes.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores, oxigênio singleto.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (Photodynamic Therapy- PDT) has been researched in several aspects of Dentistry in order to establish efficient treatment protocols for the most diverse specialties to patients, in dental care. It is a technique that consists of activating a photosensitizing agent (FS) that will produce reactive oxygen species, substances that are important for antimicrobial action. This research aimed to carry out laboratory tests in order to measure the release of singlet oxygen and superoxide radicals according to different formulations and concentrations of the dyes methylene blue (MB), eosin Y (EY) and fluorescein (FL), as well as compare the photodynamic efficiency of phenothiazine (MB) and xanthene (FL and EY) FS. For this purpose, solutions containing these compounds were analyzed in the MIX solvent (glycerol, ethanol and water) irradiated with low power laser ($\lambda = 660$ nm), and evaluated photometrically for the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which was determined by the consumption rate 1-3 diphenylisobenzofuran (DPBF), a $^1\text{O}_2$ sequestering substance, depending on the irradiation dose. Statistical analyzes were performed using the SPSS version 22.0 program using the ANOVA e Duncan tests. Results with p values <0.05 were considered significant. The data demonstrated that methylene blue obtained a greater photodynamic activity as it presented higher values regarding the decrease in DPBF, with an average of 89.9% and standard deviation of 1.8 in 150 μM , 87.6% and 2.9 for 15 μM and 77.3% and 2.5 in 1.5 μM . EY and FL obtained similar results with no significant difference between concentrations. This study concluded that methylene blue at a concentration of 150 μM expressed a greater production of $^1\text{O}_2$, which suggests a greater antimicrobial effect and highlights its relevance in relation to other dyes.

Keyword: Photodynamics, Photosensitizers, Singlet oxygen

INTRODUÇÃO

A utilização de um corante ativado por luz é uma técnica a qual são encontrados registros desde 1200-2000 a.C., onde egípcios e chineses combinavam extratos de plantas com associação a luz solar para o tratamento de doenças de pele, como o Vítigo. (PATHAK; 2014). Em 1900, foi publicado por Raab, o primeiro estudo relatando o combate ao protozoário *Paramecium caudatum* após a exposição à luz na presença de um corante de Acridina (RAAB,1900), porém com o advento dos antibióticos, tornou-se um assunto pouco explorado. Com o passar dos anos, a resistência bacteriana aos antibióticos tornou-se um dos principais desafios da medicina (SILVEIRA et.al, 2006), partindo deste princípio, têm se destacado a busca por fármacos ou alternativas terapêuticas mais eficientes ao combate a estes microrganismos.

A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy- PDT*) é uma alternativa terapêutica não invasiva que tem demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de infecções localizadas, com baixa recorrência de desenvolvimento bacteriano (HAMBLIM; HASAN, 2004). O procedimento é baseado na aplicação local de um agente fotossensibilizador (FS), ativado por uma fonte de luz, com comprimento de onda adequado, gerando assim, um estado de estimulação molecular (DUTRA, 2013). Seu efeito bactericida está diretamente relacionado à dois mecanismos: a reação do tipo I, onde ocorre a formação de radicais livres e superóxidos e a reação do tipo II, dando origem ao oxigênio singlete (1O_2), substância altamente citotóxica e a principal responsável na ação antimicrobiana do tratamento fotodinâmico (FOOTE 1991, KALKA et. al 2000, DE ROSA E BENTLEY 2000, KONOPKA E GOSLINSKI 2007).

Os FS, são compostos que apresentam características específicas como: molécula cinética e termodinamicamente estável, não se agregam em meio biológico, rápida síntese e baixos níveis de toxicidade (CASTANO, DEMIDOVA, HAMBLIN, 2004). Seu efeito antimicrobiano está relacionado ao seu potencial de ação com o sítio-alvo, sendo descrito na literatura em que bactérias Gram positivas apresentam diferentes suscetibilidades à PDT quando comparadas às bactérias Gram negativas (GEORGE e KISHEN, 2007). Os compostos fenotiazínicos, como por exemplo o azul de metileno (MB), são promissores à PDT devido as

suas características químicas e físicas. Desta forma, FS e luz na presença de oxigênio dão origem a substâncias nocivas as células, as quais são capazes de danificar estruturas como membrana, proteínas e ácidos nucleicos, causando uma destruição irreversível e possibilitando uma ampla seletividade, pois somente as células expostas ao FS e a luz, sofrerão este efeito citotóxico (SHARMAN, ALLEN e VAN LIER, 1999).

Na Odontologia, um dos principais objetivos no tratamento endodôntico é a eliminação dos microorganismos presentes nos canais radiculares. Características como formação de biofilme, resistência a medicação intracanal, anatomia dos canais radiculares e acesso restrito dos sistemas de instrumentação, fazem com que microrganismos como o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* sejam frequentemente encontrados em casos de infecções endodônticas persistentes (GOMES et.al, 2004; STUART et al, 2006). Diante disso, a PDT têm se mostrado um novo método a ser empregado mostrando resultados significativos quanto à redução microbiana, sendo sugerida como importante alternativa ao combate a infecções provocadas por microrganismos envolvendo biofilmes, como por exemplo, bactérias associadas a doenças periodontais (WAINWRIGHT e CROSSLEY 2004; MEISEL E KOCHER, 2005).

Em dentes com necrose pulpar os microrganismos formam complexos biofilmes nas paredes dos canais radiculares e alcançam profunda colonização dos túbulos dentinários (SOARES, et.al 2006). Esta infecção é essencial para a formação de abscessos, granulomas e cistos periapicais (STASHENKO et.al 1992). Um dos temas mais debatidos na endodontia tem sido o sucesso dos tratamentos realizados em sessão única em dentes com lesões periapicais (SATHORN et.al 2007;), bem como a incidência de dor pós-operatória (SU, et.al 2011, OLIVEIRA, et.al 2015) e ao reparo dessas lesões (PETERS & WESSELINK 2002; PORTENIER et.al 2005). De acordo com os aspectos infecciosos, é legítima a preocupação com esses microrganismos remanescentes, pois eles contribuem para restabelecer uma recolonização bacteriana resistente induzindo ao insucesso do tratamento primário (FABRICIUS et.al 2006; STASHENKO et.al 1992).

Neste contexto, a PDT tomou notoriedade sendo sugerida como um procedimento adjuvante, atuando de maneira eficaz à erradicação bacteriana no tratamento de lesões periapicais nos dentes em tratamento endodôntico realizados em uma única sessão. (NAGAYOSHI et al. 2011, GARCEZ et al. 2015 SIQUEIRA & ROÇAS 2011, SILVA et al. 2012,). Estudos demonstraram uma redução de 99% no canal radicular, quando o tratamento com a PDT foi implementado (FIMPLE et al. 2008, TENNERT et al. 2015).

Portanto, apesar de pesquisas laboratoriais indicarem um efeito bactericida satisfatório da PDT, os resultados encontrados nos estudos clínicos não são reconhecidos, devido ao fato de ser um assunto pouco difundido no campo de atuação e por não apresentar protocolos estabelecidos para a sua utilização na Odontologia. Estudos vêm sendo feitos, seguindo diferentes protocolos no que se diz a irradiação e diferentes tipos de FS bem como suas concentrações. (STREET; PEDIGO; LOBEL, 2009). Entretanto, pouco é encontrado sobre o desenvolvimento de novas formulações utilizando o solvente MIX (água, glicerol e etanol), o qual segundo George e Kishen (2007), apresenta efeitos benéficos á PDT.

OBJETIVOS

Objetivo Primário

Mensurar a liberação de oxigênio singleto e radicais superóxidos em função de diferentes concentrações dos FS azul de metileno, eosina y e fluoresceína;

Objetivos secundários

Determinar fotometricamente a taxa de decréscimo do DPBF em função da dose de irradiação em soluções aquosas contendo os FS estudados;

Comparar a eficiência fotodinâmica de corantes fenotiazínicos e xantenos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os corantes Eosina Y (EY), Fluoresceína (FL), e Azul de Metileno (MB) foram adquiridos da Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA. Os FS foram testados em três diferentes tipos de concentrações (15, 50 e 150 μM). As soluções destes compostos foram dispostas em uma combinação de glicerol, etanol e água (30:20:50) (solvente MIX, Kent Ridge, Singapura). Acredita-se que esta formulação de solvente potencialize a difusão do FS nos túbulos dentinários e em toda extensão do canal radicular, bem como suas complexidades anatômicas.

Segundo George e Kishen, 2007 tal proporção utilizada como solvente atua de forma eficaz na captação dos FS pelas células bacterianas, bem como sua ação bactericida quando expostos a irradiação. Usou-se LaserSmile (figura 3) a 660 nm com uma intensidade de 100 mW foi utilizado como fonte de irradiação durante 180 segundos em todas as soluções estudadas.



Figura 3. LaserSmile em modo assistido de PDT.

O espectro de absorção de 300 μM (concentração absoluta) dos FSs em diferentes concentrações foram determinados utilizando a Multileitora Spectramax Paradigm. A razão de absorvância de 664 nm foi aplicada para MB, 495 nm para FL e 535nm para EY. Em teste

piloto realizado anteriormente, em que foram estudadas as concentrações 15, 50 e 150 μM , não foram encontradas relevância em seus resultados, optou-se por ampliar a faixa das concentrações testadas para 1,5, 15 e 150 μM . As soluções foram dispostas em placa de 96 poços utilizando 6 por fileira deixando sempre o poço entre as soluções vazio, com objetivo de minimizar o efeito dissipatório da irradiação (figura 4). Como forma de controle, foram aplicadas soluções compostas apenas por cada substância presente nos tratamentos, ou seja, corantes (com e sem irradiação), DPBF (com e sem irradiação) e MIX (sem irradiação). As formulações foram armazenadas e protegidas da luminosidade desde o seu preparo até o final da leitura de toda a placa.



Figura 4. Método de irradiação das soluções.

Mensuração de Oxigênio Singlete

A análise das diferentes formulações dos corantes pesquisados foram estudadas fotometricamente em relação à taxa de produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Para isso utilizou-se uma solução de 1,3-difenilsobenzofurano (DPBF), substância reconhecida por ser um sequestrante de $^1\text{O}_2$. O DPBF, que apresenta uma intensidade de absorvância em 420 nm, foi dissolvido em álcool de cereais e acrescido as soluções de diferentes concentrações de FS. A taxa de produção de $^1\text{O}_2$ foi avaliada em relação ao índice de queda na absorvância do DPBF em 420 nm em função do tempo de irradiação.

Os dados encontrados na pesquisa foram analisados, utilizando-se o programa Excel 2017, disponível no pacote *Office (Microsoft)*. As porcentagens foram calculadas de acordo com a taxa de decréscimo do DPBF. Além disso, utilizou-se o teste de normalidade Shapiro Wilk para verificar se havia homogeneidade nas amostras e posteriormente foi usado ANOVA para

análise da diferença estatística ($p < 0,05$). A construção do banco de dados e a análise e interpretação dos resultados foram obtidas por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22.0. (Chicago IL. USA).

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, do Departamento de Farmácia/FCBS e nos Laboratórios Multiusuários de Pesquisa em Farmácia (Multifar), conforme os protocolos a seguir:

PROTOCOLO DOS EXPERIMENTOS

Preparo de soluções

1. Solução DPBF 200 μ M

Inicialmente, pesou-se 27 mg de DPBF e em seguida feita a dissolução em álcool de cereais em um balão volumétrico de 50 mL na concentração de 200 μ M. Após feito isso, foi realizada a transferência de 1 ml desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com álcool de cereais, mantendo a concentração inicial de 200 μ M.

2. Solução de Azul de Metileno (MB) 300 μ M (em água ou em mix)

Para a solução de MB, foi pesado 48 mg do corante e dissolvido em um balão volumétrico de 250 mL na concentração de 300 μ M, o mesmo foi completado com o solvente MIX

3. Solvente MIX

Para o preparo do solvente, foram misturados 30 mL de glicerol, 20 mL de álcool de cereais e 50 mL de água

Preparo das diluições para o teste

Para obter-se as concentrações de 10x, o procedimento realizado obedeceu a seguinte ordem:

Como ponto de partida, foi adicionado MB 300 μM (puro) no tubete A e 900 μL de MIX nos tubetes C, D, E, F e G. Em seguida, utilizando pipeta de precisão, transferiu-se 50 μL do tubete A para o C, 50 μL do C para o D e assim sucessivamente até o tubete E. Ao final deste procedimento, obtivemos as concentrações de MB em 1,5, 15, e 150 μM .

Protocolo do experimento

Após preparado todas as soluções e diluições, o experimento foi realizado em placa de 96 poços em sextuplicata ($n=6$).

O primeiro passo foi adicionar 100 μL das soluções de MB nos poços e em seguida 100 μL da solução de DPBF, totalizando um volume de 200 μL . Foram feitos também poços controle de cada substância de forma isolada, contendo DPBF com (1) e sem irradiação (2) (ou seja, ambos sem MB), MB com (3) e sem (4) irradiação (ou seja, sem DPBF) e solvente MIX (5).

Cada fileira foi preparada antes de sua respectiva leitura afim de evitar influências externas sobre o resultado, devido à instabilidade das soluções. Todas as soluções foram protegidas da luminosidade, com frasco âmbar e papel alumínio, por se tratar de substâncias fotossensíveis.

As soluções pesquisadas que necessitavam de irradiação, foram irradiadas por 3 minutos cada e logo em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 420 \text{ nm}$ e $\lambda = 660 \text{ nm}$, comprimento de onda de absorção máxima do DPBF e MB respectivamente.

Este procedimento foi repetido também com EY e FL, as concentrações foram as mesmas descritas no experimento com MB, alterando a quantidade utilizada e o comprimento de onda de cada corante, levando em consideração a massa molar e a razão de absorvância de cada substância, respectivamente.

RESULTADOS

As concentrações estudadas foram de 1,5, 15 e 150 μM . Observou-se que oFS MB na concentração de 150 μM apresentou um maior potencial fotodinâmico (em termos percentuais) em relação ao consumo de DPBF quando comparado aos demais. Entretanto, como pode-se observar na análise estatística 15 e 150 μM não apresentaram diferenças quanto ao nível de significância (Tabela 2). O resultado apresentou um decréscimo de DPBF 12,6% maior em relação a solução mais diluídas. (Figura 5).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos FS nas concentrações pesquisadas após a irradiação (MB- Azul de metileno; EY Eosina Y; FL Fluoresceína)

Concentrações	Corante			<i>p</i>
	MB	EY	FL	
150 μM	0,188 \pm 0,010 ^{aB}	0,362 \pm 0,098 ^{aB}	0,352 \pm 0,036 ^{aB}	0,0001
15 μM	0,231 \pm 0,049 ^{aA}	0,307 \pm 0,050 ^{aB}	0,292 \pm 0,061 ^{aAB}	0,047
1,5 μM	0,440 \pm 0,076 ^{bA}	0,283 \pm 0,034 ^{aB}	0,290 \pm 0,061 ^{aB}	0,001
<i>p</i>	0,0001	0,150	0,111	

*Letras minúsculas iguais indicam semelhança entre linhas e maiúscula iguais indicam semelhança entre colunas

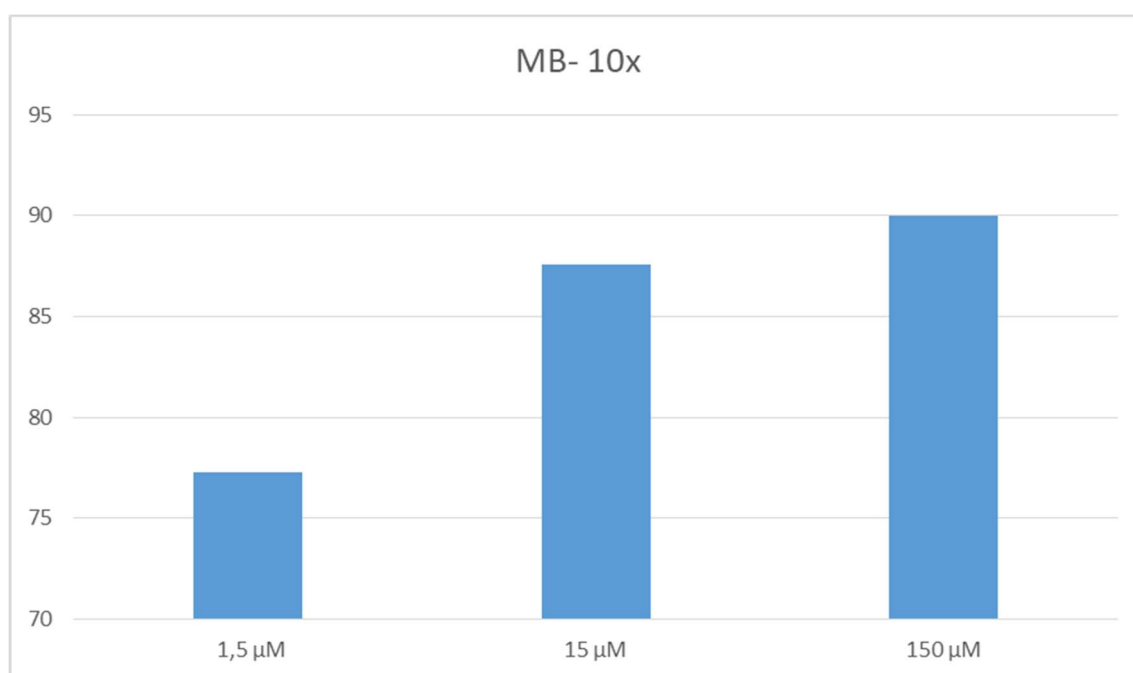


Figura 5. Consumo de DPBF em MB na diluição 10x.

Já os FS xantenos, apresentaram resultados bem semelhantes, o FS EY obteve maiores resultados nas concentrações mais diluídas, 85,3% em 1,5 μM (figura 6) e FL consumiu uma maior taxa de DPBF nas formulações em 1,5 e 15 μM (Figura 7), porém ambos apresentaram $p > 0,05$, indicando não haver diferença estatística entre eles.

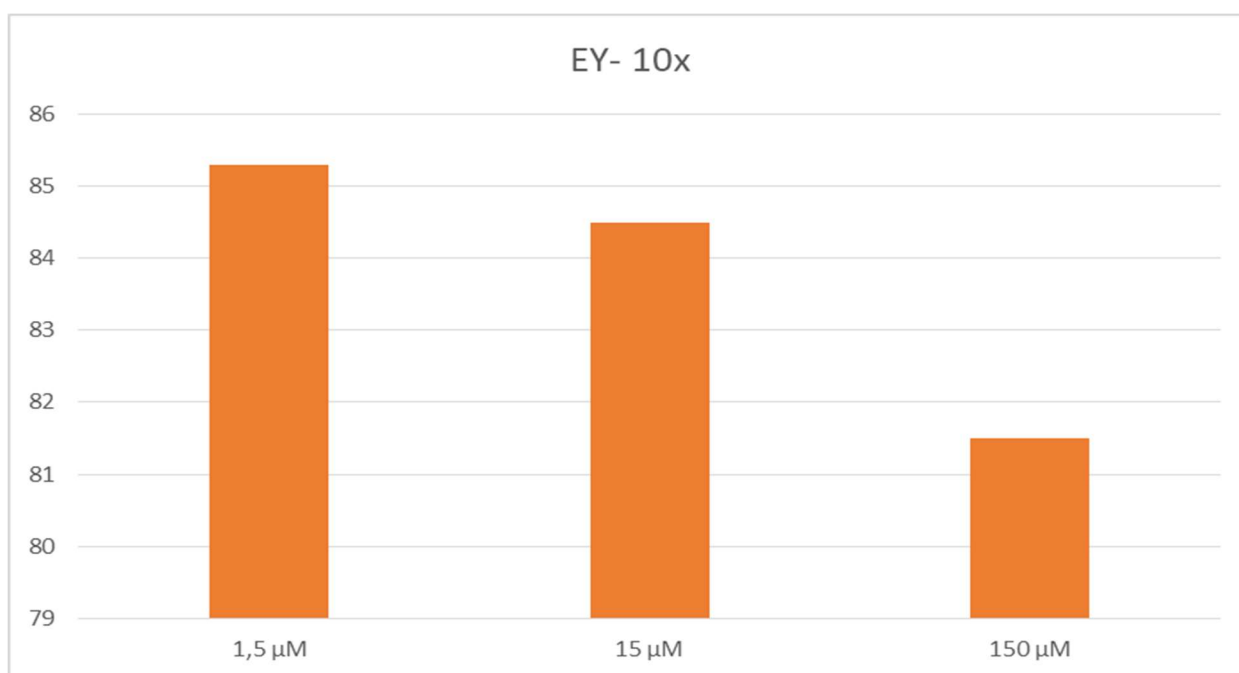


Figura 6. Consumo de DPBF em EY na diluição 10x

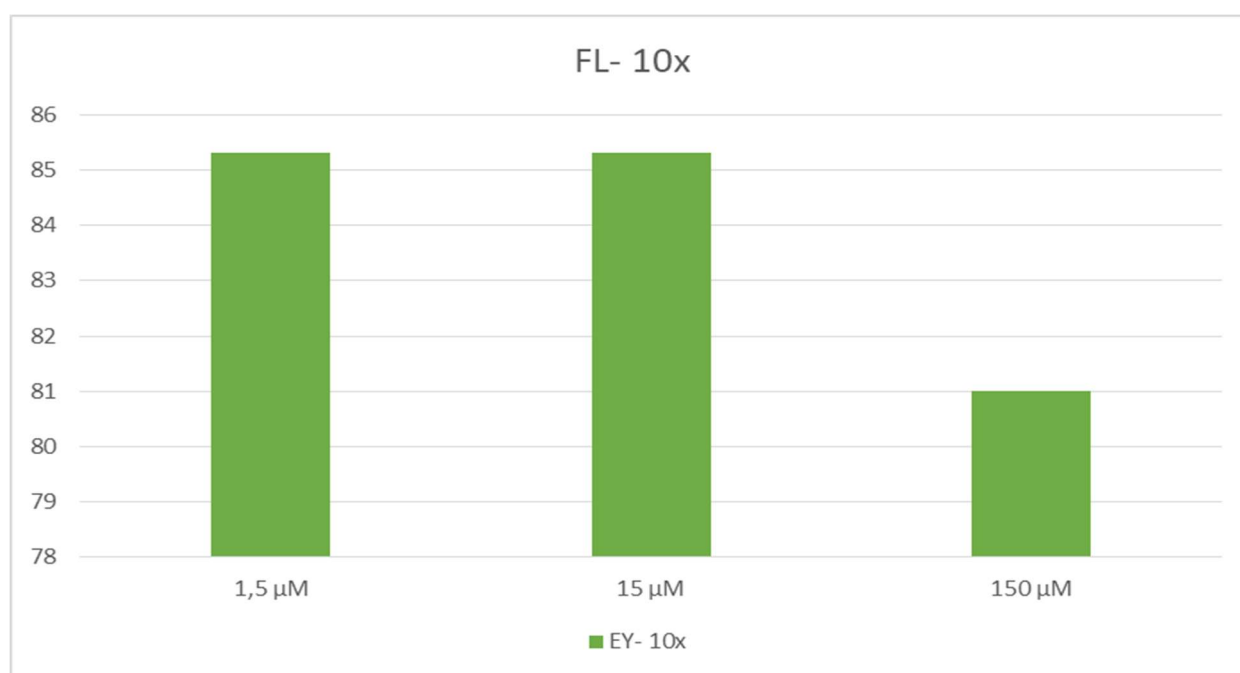


Figura 7. Consumo de DPBF em FL na diluição 10

DISCUSSÃO

Apesar de muitos estudos relatarem o efeito bactericida em microorganismos presentes na cavidade bucal, pouco é encontrado quanto a aplicação da PDT para desinfecção do conduto radicular. A PDT se torna uma alternativa de tratamento promissora devido a sua capacidade de produção de EROs e sua ação sobre as bactérias anaeróbicas, as quais são predominantemente encontradas no canal radicular. Esta pesquisa tem como objetivo a busca por uma concentração de FS que forneça o máximo de $^1\text{O}_2$ possível para uma ação bactericida eficaz.

Como no primeiro experimento, onde foram testadas as concentrações de 50, 100 e 150 μM , não encontramos diferenças significativas quanto ao consumo de DPBF e consequente produção de $^1\text{O}_2$, pode-se considerar que dentre a gama de concentrações testadas (em ambos os experimentos), de acordo com nossos resultados, a formulação de MB/MIX na concentração de 150 μM apresentou maior potencial fotodinâmico levando em consideração as características fotofísicas e fotoquímicas quando comparadas as soluções de concentração inferior (150 > 15 > 1,5 μM).

Encontra-se uma quantidade razoável de estudos que avaliam o MB em PDT, assim como sua eficácia bactericida através de cultura microbiana, porém faz-se necessário pesquisas onde são avaliadas características do MB em uma concentração de 150 μM em uma formulação contendo o solvente MIX. Diante disso, torna-se necessário mais estudos afins de avaliarem a concentração de MB e o solvente utilizado para se obter o máximo de rendimento quanto a produção de EROs, tendo como objetivo principal, a origem de $^1\text{O}_2$.

Em relação a atividade fotodinâmica dos corantes xantenos, a EY apresentou um potencial fotodinâmico melhor quando comparada a FL. Ao contrário do MB, as soluções de menor concentração consumiram uma maior quantidade de DPBF, o que nos leva acreditar que soluções mais diluídas destes FS, levam a uma maior produção de $^1\text{O}_2$.

No estudo de RIBEIRO e MIKCHA (2018), onde foi avaliado o uso da EY em PDT no combate aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, as concentrações (0,1, 0,25, 0,5, 1,0 e 5,0 μM) e tempos de iluminação avaliados reduziu significativamente o número de UFC/mL quando comparado com o controle. As maiores reduções foram observadas nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM quando combinadas a irradiação de 15 minutos. Já no trabalho de MACHADO *et al* (2010), o qual comparou os FS EY e rosa bengala em cultura de *Candida albicans*, foi observado efeito fotodinâmico a partir da concentração de 12,5 μM .

Buck (2009), investigou a eficiência fotodinâmica dos corantes xantenos eritrosina B,

eosina Y e fluoresceína e constatou que a FL apresentava um menor índice citotóxico em relação aos demais. Característica essa em conjunto com sua baixa toxidez e alta fluorescência.

Apesar dos compostos xantenos serem bons geradores de $^1\text{O}_2$, eles são menos citotóxicos do que os fenotiazínicos (BUCK,2009), pelo fato de serem FS hidrofílicos e possuírem carga negativa (-2) tendem a ser muito polares e não possuírem a capacidade de penetrar no interior celular, restringindo sua ação à membrana plasmática (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004), o que poderá acarretar uma maior probabilidade de resposta celular aumentando as chances de sobrevivência. Para que um FS apresente eficácia quando empregada a PDT, este deve apresentar um espectro de absorção de luz dentro do que é conhecido como “janela terapêutica” (600-800 nm), quanto maior for o comprimento de onda da fonte de luz, maior também será a penetração no sítio-alvo (SIMPLICIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002). Comprimentos de onda menores que a janela terapêutica sofrem espalhamento e são absorvidos por cromóforos endógenos, como exemplo a hemoglobina (KÜBLER, 2005; ALLISON *et al*, 2004). Já comprimento de onda maiores que 800nm, são absorvidos pela água e não possuem energia o suficiente para a produção de $^1\text{O}_2$ (RAVANAT *et al*, 2000; MEISEL E KOCHER, 2005). Desta maneira, os corantes xantenos estudados necessitam de mudanças estruturais que façam que seu comprimento de onda se encontre dentro de 600-800nm para sua maior eficácia em humanos (WANG *et al*, 2006)

Em contrapartida, o corante fenotiazínicos MB, apresenta absorção máxima em 660 nm e por ser um composto lipofílico e possuir carga positiva, pode se difundir pela membrana plasmática, tendo seu efeito oxidativo presente também no meio intracelular. Estudos demonstram que o MB têm sua ação primária nos lisossomos e depois penetram o núcleo celular (WALKER *et al*, 2004; HARRIS *et al* 2004). Para tanto, recomenda-se outros estudos que avaliem a formulação MB/MIX em meio a diferentes tempos de irradiação, bem como a sua citotoxicidade bacteriana, para que se obtenha seu máximo poder antimicrobiano e consequente uso em PDT.

CONCLUSÃO

Diante dos achados do presente estudo, pode-se concluir que a solução MB/MIX na concentração de 150 μM , apresenta uma maior eficácia dentre as substâncias e concentrações testadas. Em relação aos FS xantenos, apesar de observarmos boas atividades fotodinâmicas, o mesmo apresentam desvantagens quanto ao MB para o uso em PDT para em odontologia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo laboratorial contribui para uma idealização de um protocolo a ser seguido para que se obtenha uma máxima ação antimicrobiana quando empregada a terapia fotodinâmica como tratamento adjuvante à desinfecção bacteriana. Nos resultados iniciais revelaram que o fotossensibilizador azul de metileno em solvente MIX apresentou maior porcentagem quanto a produção de oxigênio singleto, o que evidencia sua eficiência para o uso em odontologia. Contudo, ainda há uma necessidade de mais estudos que avaliem a formulação que demonstrou melhores resultados, bem como a sua toxicidade em humanos.

REFERÊNCIAS

Ball, D. J., et al. "A indução de apoptose por um derivado de azul de metileno carregado positivamente." **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 42.2 (1998): 159-163.

Bergmans L, *et.al.* Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J.** 2008 Mar;41(3):227-39.

BONSOR S, NICHOL R, REID TM, PEARSON GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. **Br Dent J** 2006; 201:101–105.

BUCK, S. T. G. **Relação entre Eficiência Fotodinâmica, Citotoxicidade e Propriedades Moleculares de Corantes Para Aplicação em Terapia Fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2009.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2004; 1 (4): 279-293.

CRAIG RA, MCCOY CP, GORMAN SP, JONES DS. Photosensitisers - the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. **Expert Opin Drug Deliv.** 2015;12(1):85-101.

DE ROSA FS, BENTLEY MV. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharm Res.** 2000;17(12):1447-1455.

FABRICIUS L, DAHLÉN G, SUNDQVIST G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. **Eur J Oral Sci** 2006; 114:278-85.

FIMPLE JL, FONTANA CR, FOSCHI F, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod.** 2008;34:728-34.

FONSECA MB, JÚNIOR PO, PALLOTA RC, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomed Laser Surg.** 2008;26(3):209-213. Doi:10.1089/pho.2007.2124

FOOTE, CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.** 54, 659, 1991.

FOSCHI F, *et. al.* Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. **Lasers Surg Med.** 2007 Dec;39(10):782-7.

GARCEZ AS, NUÑEZ SC, HAMBLIN MR, RIBEIRO MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod.** 2008;34(2):138-142.

GARCEZ AS, RIBEIRO MS, TEGOS GP, NÚÑEZ SC, JORGE AO, HAMBLIN MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med.** 2007 Jan;39(1):59-66.

GEORGE S, KISHEN A. Optimization of an advanced non-invasive light activated disinfection strategy. Proceedings of SPIE-V 6633 Biophotonics 2007: Optics in Life Science. **J Popp**, G Von Bally, eds. 663318 (2007).

GEORGE S, KISHEN A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **J Biomed Opt.** 2007; 12:034029.

GEORGE S, KISHEN A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. **Photochem Photobiol.** 2008;84(3):734-740.

GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 4, October 2006.

HAMBLIN MR, HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci.** 2004;3:436–450.

KALKA K, MERK H, MUKHTAR H. Photodynamic therapy in dermatology [published correction appears in *J Am Acad Dermatol* 2000 Oct;43(4):609] [published correction appears in **J Am Acad Dermatol.** 2001 Jan;44(1):150]. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(3):389-416.

KONOPKA K, GOSLINSKI T. Photodynamic therapy in dentistry [published correction appears in *J Dent Res.* 2007 Nov;86(11):1126]. **J Dent Res.** 2007;86(8):694-707.

KOMERIK, N. MACROBERT, A.J; Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections, **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 25 (1–2), 487 –504 (2006). 0731-8898

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

NUNEZ, S. C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica.** 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAGONIS TC, CHEN J, FONTANA CR, et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **J Endod.** 2010;36(2):322-328.

PATHAK MA, FITZPATRICK TB. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **J Photochem Photobiol B.** 1992;14(1-2):3-22.

PETERS LB, WESSELINK PR. Periapical healing of endodontically treated in one and two visits obtured in the presence or absence of detectable microorganisms. **IntEndod** 2002; 35:660-7.

PORTENIER I, WALTIMO T, ØRSTAVIK D, HAAPASALO M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. **J Endod**. 2005;31:380-6.

RAAB, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol.**, 39 524 –546 (1900). 0372-8366 .

RIOS A1, *et.al*. Evaluation of photodynamic therapy using a lightemitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **J Endod** 2011; 37(6):856-9.

SATHORN C, PARASHOS P, MESSER H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. **IntEndod J**. 2007 Jan;40(1):2-10.

SCHWEITZER, C. SCHMIDT, R; (2003). "Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen". **Chemical Reviews** 71: 1685-1757. Doi:10.1021/cr010371

SEVERINO, D; JUNQUEIRA, H. C; GUGLIOTTI, M; GABRIELLI, D. S.; BAPTISTA, M. S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, Lawrence, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

SILVEIRA, G. P *et.al*. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 844-855, julho de 2006.

SIQUEIRA JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J** 2001; 34:1–10.

SOARES JA, LEONARDO MR, Silva LAB, TANOMARU FILHO M, ITO IY. Histomicrobiologic aspects of the root canal system and periapical lesions in dogs' teeth after rotary instrumentation and intracanal dressing with Ca(OH)₂ pastes. **J Appl Oral Sci** 2006; 14:355-64

SOUZA LC, *et.al*. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **J Endod** 2010; 36(2):292-6.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod**, v. 32, n. 2, p. 93-98, February 2006.

SU Y, WANG C, Ye L. Healing rate and post-obturation pain of single- versus multiple-visit endodontic treatment for infected root canals: a systematic review. **J Endod**. 2011 Feb;37(2):125-32.

VAZIRI S, KANGARLOU A, SHAHBAZI R, NAZARI NASAB A, NASERI M. Comparação da eficácia bactericida da terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio a 2,5% e

clorexidina a 2% contra clorexidina contra *Enterococcus faecalis* em canais radiculares; um estudo in vitro. **Dent Res J (Isfahan)**. 2012; 9 (5): 613-618

WAINWRIGHT, M, CROSSLEY, K.B. Photosensitising agents- circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **Int. Biodeter. Biodegrad.** V.53, pp. 119-126

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, mai. 2004.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, pág. 988-994, 2007.

DIWU, Z; LOWN, J. W. Potencial fototerapêutico de fotossensibilizadores alternativos às porfirinas. **Pharmacology & therapeutics**, v. 63, n. 1, pág. 1-35, 1994.

STREET, Cale; LOEBEL, Nicolas; PEDIGO, Lisa. Composição e método de tratamento de MRSA. Patente dos EUA n. 8.247.406, 21 atrás. 2012

Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2009 Sep-Dec;6(3-4):170-88.

Hussain S, Harris F, Phoenix DA. The phototoxicity of phenothiazinium-based photosensitizers to bacterial membranes. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 2006 Feb;46(1):124-30.

WANG, Z.-S.; YANAGIDA, M.; SAYAMA, K.; SUGIHARA, H. Electronic-insulating coating of CaCO₃ on TiO₂ electrode in dye-sensitized solar cells: improvement of electron lifetime and efficiency. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 12, p. 2912-2916, 2006.

PHOENIX, D. A. et al. Antimicrobial therapy: old problems--new solutions. **JEC. Qual. L**, v. 1, p. 44-61, 2003.

PATIL, Kesharsingh; PAWAR, Rajesh; TALAP, Pandurang. Autoagregação de azul de metileno em meio aquoso e soluções aquosas de Bu 4 NBr e uréia. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, n. 19, pág. 4313-4317, 2000.

PARSEK, Matthew R.; SINGH, Pradeep K. Biofilmes bacterianos: um link emergente para a patogênese da doença. **Revisões anuais em Microbiologia**, v. 57, n. 1, pág. 677-701, 2003.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, p.801-807, 2002.

KÜBLER, A.C. Photodynamic therapy. **Medical Laser application**, v.20, p.37-45, 2005.

RAVANAT, J.L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.G.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **The journal of Biological Chemistry**, v.275, p.40601-40604, 2000.

WANG, H.; LU, L.; ZHU, S.; LI, Y.; CAI, W. The phototoxicity of xanthene derivatives against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Currente Microbiology**, v.52, p.1-5, 2006.

WALKER, I.; GORMAN, S.A.; COX, R.D.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S.B. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.3, p.653-659, 2004.

HARRIS, F.; SAYED, Z.; HUSSAIN, S.; PHOENIX, D.A. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitisers to act as PDT agents. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p.231-239, 2004.

CAVALCANTE, R.S. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. Dissertação (Química Analítica São Carlos) - Universidade de São Paulo.

Tabelas de dados da leitura feita pela Multileitora Spectramax Paradigm

Basic Endpoint Protocol

Use this protocol for endpoint assays that have unknowns that will have concentrations interpolated from a standard curve. Modify the instrument setup for the wavelength(s) of interest for your assay. You may also modify the template to include additional standards, unknowns, and controls. To make modifications, click the plate section to make it active.

READER SUITABILITY:

SpectraMax M2, M2e, M3, M4, M5, and M5e.

SpectraMax Plus 384, 190, SpectraMax 190, 340PC 384 and VersaMax
Emax and Vmax

PROTOCOL REVISION HISTORY:

03/02/11 - Imported from 5.4 and edited. (ELM)

10/11/11 - Updated with the additional instruments supported in SMP 6.1

Leitura 1 DPBF e mix sem radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.138	0.098	0.171	0.064	0.164	0.085	0.294	0.084	0.212	0.059	0.215	0.072
B	1.951	0.070	2.024	0.059	2.050	0.068	1.713	0.071	1.943	0.052	2.077	0.063
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:25 08/10/2020

Mean Temperature : 28 °C

Leitura 2 DPBF com radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	1.929	0.060	1.961	0.064	1.959	0.074	1.903	0.056	1.877	0.054	1.860	0.052
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:49 08/10/2020

Mean Temperature : 28.5 °C

Leitura 3 - MB com radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	0.198	0.077	0.229	0.075	0.265	0.067	0.308	0.060	0.237	0.051	0.300	0.072
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:22 08/10/2020

Mean Temperature : 29 °C

Leitura 4 - MB irradiada 664

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	0.197 3.035	0.078 0.051	0.223 3.095	0.074 0.054	0.271 3.107	0.068 0.049	0.292 3.114	0.060 0.048	0.228 3.104	0.050 0.043	0.306 3.078	0.072 0.055
E	0.143 0.608	0.075 0.055	0.159 0.733	0.068 0.054	0.166 1.051	0.072 0.050	0.149 1.186	0.077 0.054	0.170 0.890	0.050 0.045	0.195 1.296	0.059 0.048
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:48 08/10/2020

Mean Temperature : 29.5 °C

Leitura 5 - segundo tratamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F	0.152	0.062	0.187	0.064	0.190	0.059	0.215	0.068	0.200	0.059	0.244	0.064
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:17 08/10/2020

Mean Temperature : 30 °C

Leitura 6 - terceiro tratamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	0.163	0.067	0.163	0.055	0.202	0.059	0.206	0.053	0.257	0.069	0.246	0.060
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:44 08/10/2020

Mean Temperature : 30 °C

Leitura 7 - MB sem irradiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	0.172 3.108	0.058 0.047	0.203 3.047	0.063 0.049	0.202 3.079	0.056 0.048	0.249 3.124	0.056 0.046	0.228 3.023	0.060 0.049	0.237 3.132	0.065 0.050

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:49 08/10/2020

Mean Temperature : 30 °C

Leitura 8 - placa toda

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.152	0.095	0.176	0.060	0.196	0.086	0.205	0.088	0.221	0.061	0.204	0.070
B	1.059	0.069	1.231	0.057	1.177	0.067	0.711	0.069	1.008	0.052	1.112	0.065
C	1.222	0.060	1.236	0.065	1.261	0.071	1.156	0.057	1.182	0.052	1.050	0.069
D	0.234	0.078	0.266	0.073	0.221	0.067	0.231	0.079	0.273	0.048	0.299	0.068
E	0.135	0.079	0.179	0.061	0.187	0.070	0.186	0.073	0.211	0.053	0.227	0.057
F	0.160	0.066	0.175	0.064	0.156	0.060	0.159	0.069	0.180	0.060	0.205	0.070
G	0.167	0.066	0.200	0.055	0.203	0.059	0.217	0.053	0.244	0.069	0.233	0.060
H	0.199	0.057	0.211	0.060	0.173	0.056	0.208	0.056	0.230	0.061	0.262	0.067

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
▲ More Settings
Shake Off
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:50 08/10/2020

Mean Temperature : 30 °C

Leitura 1 DPBF e mix c/ radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.180 0.438	0.181 0.564	0.176 0.773	0.196 0.880	0.203 0.753	0.193 0.862	0.070 0.062	0.079 0.060	0.071 0.058	0.058 0.049	0.058 0.050	0.072 0.056
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:12 02/12/2020

Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 2 DPBF com radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	0.509 0.126	0.251 0.167	0.208 0.174	0.197 0.174	0.189 0.181	0.221 0.153	0.114 0.098	0.055 0.045	0.054 0.050	0.051 0.046	0.044 0.042	0.073 0.069
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:30 02/12/2020

Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 3 - MB com radiação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	0.119 0.077	0.335 0.149	0.213 0.158	0.480 0.131	0.436 0.143	0.539 0.149	0.049 0.048	0.076 0.054	0.077 0.061	0.047 0.044	0.061 0.053	0.064 0.053
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:51 02/12/2020

Mean Temperature : 25 °C

Leitura 4 - MB irradiada 664

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	0.875 0.164	0.849 0.170	0.611 0.168	0.728 0.157	0.742 0.179	0.704 0.157	0.054 0.051	0.058 0.055	0.073 0.060	0.076 0.057	0.052 0.048	0.065 0.053
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:10 02/12/2020

Mean Temperature : 25.5 °C

Leitura 5 - segundo tratamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	0.528 0.107	0.784 0.168	0.461 0.135	0.837 0.151	0.232 0.166	0.752 0.145	0.059 0.058	0.070 0.059	0.072 0.058	0.057 0.050	0.061 0.052	0.068 0.056

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:30 02/12/2020
Mean Temperature : 25.5 °C

Leitura 6 - terceiro tratamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.168 0.423	0.205 0.568	0.179 0.709	0.192 0.838	0.196 0.730	0.197 0.840	0.069 0.062	0.079 0.061	0.072 0.058	0.058 0.050	0.059 0.051	0.073 0.059
B	0.091 0.076	0.066 0.051	0.061 0.050	0.061 0.049	0.055 0.047	0.070 0.051	0.070 0.060	0.069 0.056	0.052 0.047	0.055 0.049	0.045 0.044	0.056 0.052
C	0.238 0.213	0.188 0.153	0.208 0.193	0.233 0.202	0.208 0.201	0.195 0.187	0.117 0.101	0.055 0.045	0.057 0.053	0.052 0.046	0.050 0.046	0.070 0.066
D	0.074 0.056	0.078 0.054	0.061 0.054	0.085 0.064	0.074 0.062	0.082 0.063	0.062 0.056	0.076 0.068	0.069 0.056	0.047 0.043	0.050 0.047	0.066 0.054
E	0.165 0.133	0.274 0.198	0.214 0.168	0.353 0.157	0.378 0.201	0.432 0.175	0.049 0.047	0.075 0.054	0.078 0.061	0.048 0.044	0.060 0.052	0.055 0.047
F	0.065 0.056	0.070 0.056	0.077 0.063	0.086 0.065	0.087 0.069	0.057 0.049	0.049 0.046	0.069 0.054	0.061 0.051	0.059 0.054	0.057 0.049	0.083 0.070
G	0.680 0.165	0.699 0.161	0.488 0.185	0.596 0.153	0.603 0.227	0.545 0.176	0.051 0.049	0.061 0.056	0.072 0.059	0.076 0.057	0.051 0.047	0.064 0.052
H	0.543 0.122	0.736 0.134	0.413 0.136	0.828 0.132	0.206 0.155	0.750 0.172	0.057 0.056	0.071 0.060	0.072 0.057	0.057 0.049	0.060 0.051	0.067 0.056

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 664
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:32 02/12/2020
Mean Temperature : 25.5 °C

Leitura 1 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.263 0.819	0.057 0.056	0.287 1.476	0.061 0.058	0.300 1.159	0.066 0.058	0.414 1.123	0.100 0.085	0.525 1.242	0.173 0.159	0.383 1.006	0.096 0.088
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:23 18/01/2021

Mean Temperature : 23 °C

Leitura 2 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.260 0.293	0.058 0.056	0.269 0.332	0.041 0.041	0.264 0.354	0.060 0.056	0.360 0.377	0.060 0.059	0.370 0.371	0.065 0.058	0.323 0.359	0.070 0.067
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:44 18/01/2021

Mean Temperature : 23.5 °C

Leitura 3 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	0.221 0.180	0.090 0.081	0.305 0.217	0.078 0.075	0.226 0.201	0.050 0.049	0.272 0.231	0.057 0.055	0.301 0.261	0.063 0.057	0.323 0.249	0.077 0.069
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:52 18/01/2021

Mean Temperature : 24 °C

leitura 4 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	2.707	0.052	2.705	0.065	2.717	0.049	2.723	0.075	2.732	0.074	2.706	0.088
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:16 18/01/2021

Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 5 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	2.682	0.066	2.724	0.063	2.734	0.050	2.751	0.060	2.736	0.071	2.743	0.085
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:19 18/01/2021

Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 6 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.140	0.053	0.158	0.055	0.179	0.051	0.235	0.076	0.286	0.140	0.214	0.089
B	0.160	0.053	0.159	0.040	0.157	0.055	0.180	0.056	0.191	0.055	0.252	0.065
C	0.183	0.074	0.180	0.063	0.154	0.049	0.222	0.051	0.247	0.053	0.254	0.067
D	0.185	0.036	0.197	0.062	0.136	0.050	0.151	0.072	0.227	0.065	0.271	0.090
E	0.170	0.061	0.201	0.058	0.232	0.048	0.217	0.055	0.277	0.069	0.227	0.078
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 660
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:21 18/01/2021

Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 1 Fluorescência

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385 0.474	0.093 0.084	0.294 0.316	0.069 0.064	0.342 0.220	0.088 0.080	0.337 0.214	0.084 0.074	0.390 0.281	0.058 0.053	0.369 0.251	0.071 0.065
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:57 18/01/2021

Mean Temperature : 25 °C

leitura 4 Fluorescência

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.241 0.196	0.070 0.061	0.230 0.179	0.067 0.061	0.251 0.215	0.075 0.065	0.339 0.274	0.072 0.064	0.381 0.286	0.062 0.059	0.313 0.252	0.059 0.054
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:21 18/01/2021

Mean Temperature : 25 °C

Leitura 5 Fluoresceína

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	0.213 0.179	0.065 0.059	0.240 0.182	0.059 0.053	0.271 0.201	0.082 0.071	0.334 0.223	0.066 0.061	0.377 0.276	0.055 0.051	0.310 0.259	0.068 0.065
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:43 18/01/2021

Mean Temperature : 25.5 °C

Leitura 1 Fluoresceína

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.385 0.474	0.093 0.084	0.294 0.316	0.069 0.064	0.342 0.220	0.088 0.080	0.337 0.214	0.084 0.074	0.390 0.281	0.058 0.053	0.369 0.251	0.071 0.065
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:57 18/01/2021

Mean Temperature : 25 °C

leitura 4 Fluoresceína

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0.241 0.196	0.070 0.061	0.230 0.179	0.067 0.061	0.251 0.215	0.075 0.065	0.339 0.274	0.072 0.064	0.381 0.286	0.062 0.059	0.313 0.252	0.059 0.054
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 11:21 18/01/2021

Mean Temperature : 25 °C

Leitura 3 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	0.221 0.180	0.090 0.081	0.305 0.217	0.078 0.075	0.226 0.201	0.050 0.049	0.272 0.231	0.057 0.055	0.301 0.261	0.063 0.057	0.323 0.249	0.077 0.069
D												
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 420
Lm2 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 09:52 18/01/2021
Mean Temperature : 24 °C

leitura 4 Eosina Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	2.707	0.052	2.705	0.065	2.717	0.049	2.723	0.075	2.732	0.074	2.706	0.088
E												
F												
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 535
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 10:16 18/01/2021
Mean Temperature : 24.5 °C

Leitura 6 Fluoresceína

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	2.392	0.066	2.393	0.078	2.366	0.094	2.390	0.063	2.384	0.066	2.382	0.051
F	2.391	0.066	2.394	0.072	2.402	0.053	2.386	0.061	2.399	0.057	2.395	0.079
G												
H												

Reduction Settings

Optical Density
Wavelength Combination : !Lm1

Settings Information

Endpoint
Absorbance
▲ ABS-MONO (s/n 2217)
Lm1 495
▲ More Settings
Shake 5s Lin., Med.
ReadOrder Row
Show Optimizer On

Read Information

SpectraMax Paradigm
ROM vV1.2 b100 29.09.2014
Start Read : 12:07 18/01/2021
Mean Temperature : 25.5 °C