



VIVIENE SANTANA BARBOSA

**“ANALISE DOS EFEITOS DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA, DA CLOREXIDINA E DO IODO  
POVIDINE NA PERIODONTITE INDUZIDA EM  
RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E  
MICROBIOLÓGICO”**

Piracicaba  
2013







**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**VIVIENE SANTANA BARBOSA**

**“ANÁLISE DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA,  
DA CLOREXIDINA E DO IODO POVIDINE NA  
PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS: ESTUDO  
HISTOLÓGICO E MICROBIOLÓGICO”**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA  
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM  
CLÍNICA ODONTOLÓGICA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO  
EM PERIODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação  
defendida pela aluna Vivienne Santana Barbosa e orientada  
pelo Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum.

---

ANTÔNIO WILSON SALLUM

**Piracicaba  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B234a                      Barbosa, Viviane Santana, 1982-  
                                Análise dos efeitos da terapia fotodinâmica, da clorexidina e  
do iodo povidine na periodontite induzida em ratos: estudo  
histológico e microbiológico / Viviane Santana Barbosa. --  
Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

                                Orientador: Antônio Wilson Sallum.  
                                Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

                                1. Periodontia. 2. Curcumina. I. Sallum, Antonio Wilson, 1943-  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Analysis of the effects of photodynamic therapy,  
chlorhexidine and povidone-iodine in induced periodontitis in rats: histological  
and microbiological study

**Palavras-chave em Inglês:**

Periodontics

Curcumin

**Área de concentração:** Periodontia

**Titulação:** Mestra em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Antônio Wilson Sallum [Orientador]

Ângela Guimarães Martins

Rafael Nobrega Stipp

**Data da defesa:** 27-03-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Março de 2013, considerou a candidata VIVIENE SANTANA BARBOSA aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Antonio Wilson Sallum", written over a horizontal line.

Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Angela Guimarães Martins", written over a horizontal line.

Prof.ª. Dra. ANGELA GUIMARÃES MARTINS

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rafael Nobrega Stipp", written over a horizontal line.

Prof. Dr. RAFAEL NOBREGA STIPP



Dedico esse trabalho:

A meus pais, Milton e Lidineia,  
pelo amor incondicional e por  
acreditarem nos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Nissí Vitória e  
Priscilla, pela compreensão nos  
momentos ausentes e pelo  
incentivo nas horas mais difíceis.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, por permitir a realização desse sonho e por cuidar de mim nos mínimos detalhes. A Ele toda honra e glória.

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.

À Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Garcia Rodrigues, presidente da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e ao Prof. Dr. Márcio de Moraes, coordenador do programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, pela grande oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pelos cuidados e por sempre ter uma palavra de incentivo e encorajamento para tornar essa caminhada muito mais fácil.

Aos professores da Periodontia da FOP, Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior, Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati e Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, pelos ensinamentos e por contribuírem na minha formação.

À minha banca de qualificação: Profa. Dra. Karina Ruiz, Prof. Dra. Cristiane Salmon e Prof. Dr. Marcelo Marques por contribuírem de forma essencial para o aprimoramento desse trabalho.

Aos bioteristas da FOP-Unicamp Wanderley Vieira e Leandro, pelo cuidado dispensado aos animais.

Aos meus colegas de Pós-graduação: Ana Regina, Camila, Mayra, Miki, Thiago Taiete e Thiago Tarbes pelo companherismo e ajuda nessa jornada.

À Camila Camarinha, minha amiga-irmã, por compartilhar comigo todos os momentos dessa jornada, pelo carinho, amizade e pelo companherismo. Essa caminhada ficou muito mais leve por ter você para dividir o peso comigo e com certeza sem você tudo isso seria muito mais difícil. Muito obrigada por tudo!!

À Mirella Lindoso, minha amiga, a quem devo muito pelos ensinamentos adquiridos, com quem aprendi tudo sobre o manejo com os animais no biotério, por mostrar o “caminho das pedras” e me ajudar a trilhar esse caminho de forma muito mais fácil. Muito obrigada pela companhia, pela amizade, pelo carinho, paciência, pelos momentos de descontração e em especial por todos os ensinamentos.

À Ana Paula Giorgetti, por me ajudar em todos os momentos que precisei sem nunca dizer um “não”, por sua alegria contagiante, pela sua amizade e por todos os momentos compartilhados. Muito obrigada!!

À Mônica Grazieli, que embora os momentos juntas tenham sido poucos, foram momentos especiais. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

A Lucas Queiroz, Lucas Moura e Hugo Vale pelos momentos compartilhados.

À Renato Casarin, pelos ensinamentos, carinho e pelo auxílio nas análises estatísticas do trabalho.

À Mariana Fergolin pela paciência em me ensinar o manejo dos materiais no laboratório e pela ajuda nos processamentos histológicos.

À Cidinha e à Eliene da histologia, pelos auxílios e orientações nos processamentos histológicos e utilização do microscópio.

À Regina, secretária da Periodontia, pelo carinho, paciência, presteza e eficiência em atender nossos pedidos e sempre nos ajudar com uma palavra de conforto nos momentos difíceis.



Ao Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp, que com muita paciência me mostrou as maravilhas da microbiologia e por aceitar prontamente fazer parte da minha banca de defesa. Muito obrigada pela atenção dispensada e pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Ângela Guimarães Martins, peça fundamental na minha formação acadêmica. Muito obrigada por participar desse momento tão especial da minha vida, aceitando fazer parte da minha banca. Isso tem um significado muito grande para mim. Muito obrigada por todos os ensinamentos!!

À Ariane Romani e família, por me acolherem de forma especial em Piracicaba. Muito obrigada pelo carinho, amizade e pelos cuidados. Só Deus para recompensá-los por tudo que vocês fazem por mim.

À tia Eliana, tio Camilo, Dani, Marcelo e Camila, minha família paulista a quem tenho muito a agradecer pelo carinho e por cuidar de mim de forma toda especial. Deus continue abençoando vocês grandemente.

A Ricardo Vinturi, meu amor, a quem agradeço pelo companherismo, pelo carinho, pelos cuidados, por sempre estar ao meu lado me apoiando e me dando força. Tê-lo em minha vida é o maior presente de Deus. Muito obrigada por tudo!

À minhas irmãs, Nissí Vitória e Priscilla, por entenderem a minha ausência e por sempre me incentivarem a seguir em frente.

A meus pais, Milton e Lidineia, exemplos de determinação, fé e perseverança. Muito obrigada por sempre acreditarem nos meus sonhos, por confiarem em mim e pelo amor incondicional. Muito obrigada por me mostrarem que se tiver Deus no comando da minha vida, não há obstáculo que não possa ser superado. Amo vocês!!!

A todos os meus familiares e amigos que direta e indiretamente contribuíram para que esse sonho se concretizasse.



## EPÍGRAFE

***“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.***

***Amyr Klink***



## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar, histológica e microbiologicamente, a ação da TFD, da clorexidina a 0,12% (CLX) e do iodo povidine a 10% (PVP-I), na periodontite experimental induzida em ratos. Para isso, 28 ratos Wistar receberam bilateralmente inserção de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores no *baseline*. Os lados foram aleatoriamente escolhidos para receber só inserção de ligadura (grupo controle) ou ligadura e uma das seguintes terapias: PVP-I a 10% (n=10), CLX a 0,12% (n=8) e TFD (n=10). Cada grupo recebeu o respectivo tratamento em três períodos: 7, 14 e 21 dias após indução da periodontite. Histometricamente, não foi observada diferença estatística na avaliação intergrupo e intragrupo, no que diz respeito à redução da reabsorção óssea alveolar ( $p>0,05$ ). Histoquimicamente, a avaliação intragrupo mostrou que o grupo TFD apresentou um número menor de células TRAP-positivas/mm quando comparado o lado tratado com o lado não-tratado ( $p<0,05$ ). No entanto, não houve diferença estatística nos grupos CLX e PVP-I, quando avaliados os respectivos lados que receberam terapia e os lados controle. Na avaliação entre as terapias, não foi possível verificar diferenças significativas na contagem de células TRAP-positivas em todos os grupos avaliados ( $p>0,05$ ). Na avaliação microbiológica, houve uma redução significativa na carga microbiana nos molares tratados com PVP-I ( $p=0,03$ ), apontando uma boa efetividade do tratamento. Dentre os molares tratados com CLX, houve uma tendência positiva para redução microbiana através dessa terapia ( $p=0,10$ ). A TFD apresentou um efeito antimicrobiano apenas em alguns animais, porém sem diferença significativa entre o lado tratado e não tratado ( $p=0,54$ ). Sendo assim, pode-se concluir que os três agentes mostraram um efeito antimicrobiano sobre os microrganismos totais, porém, como terapia, somente o PVP-I foi eficaz na redução do biofilme bacteriano. No que diz respeito à reabsorção, as três terapias não foram capazes de impedir a reabsorção óssea alveolar nos molares dos ratos ao final dos 21 dias de estudo.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, clorexidina, iodo povidine



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate histologically and microbiologically, the action of PDT, of the chlorhexidine 0.12% (CLX) and povidone iodine 10% (PVP-I) in a experimental rat periodontal disease model. For this purpose, 28 Wistar rats received bilateral ligature in both mandible first molars at *baseline*. The sides were randomly assigned to receive ligature only (control group) or ligature and one of the following therapies: PVP-I 10% (n=10), chlorhexidine 0.12% (n=8) and PDT (n=10). Each group received their treatment in three periods: 7, 14 and 21 days. Histometrically, no statistical difference was seen in the intragroup and intergroup evaluation, regarding the reduction of alveolar bone resorption ( $p>0.05$ ). Histochemically, the evaluation intragroup showed that the group of PDT showed a smaller number of cells TRAP-positivas/mm when compared to CLX group ( $p<0.05$ ). However, there was no statistical difference in the groups CLX and PVP-I, when evaluated the respective sides receiving therapy and control sides. In the evaluation of therapies, it was not possible to verify significant differences in counting TRAP-positive cells in all groups ( $p>0.05$ ). In microbiological evaluation, there was a significant reduction in microbial load in molars treated with PVP-I ( $p=0.03$ ), indicating a good treatment effectiveness. Among the molars treated with CLX, there was a positive trend towards reduction through this therapy ( $p=0.10$ ). PDT showed an antimicrobial effect only in some animals, but no significant difference between the treated side and untreated ( $p=0.54$ ). Therefore, one can conclude that the three agents shown an antimicrobial effect on the total microorganisms, however, as the therapy, only the PVP-I was effective in reducing the bacterial biofilm. With respect to absorption, the three treatments were not able to prevent alveolar bone resorption in molars of the rats at the end of the 21 day study.

Key-words: photodynamic therapy, clorhexidine, povidine iodine





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*Aa* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

CLX - Clorexidina

*Fn* – *Fusobacterium nucleatum*

IP – Índice de placa

LED – Light Emiting Diodes

μl – Microlitro

μm – Micrômetro

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Oxigênio singleto

S<sub>1</sub> – Estado singleto

T<sub>1</sub> – Estado tripleto

λ – Comprimento de onda

Mmol/L – milimolar por litro

NIC – Nível de inserção clínica

*Pg* – *Porphyromonas gingivalis*

PS – Profundidade de sondagem

PVP-I – Iodo povidine

RAR – Raspagem e alisamento radicular

RTF – Meio de transporte fluido reduzido

SS – Sangramento à sondagem

*Td* – *Treponema denticola*

*Tf* – *Tannerella forsythia*

TFD – Terapia fotodinâmica

UFC – Unidades formadoras de colônias



# SUMÁRIO

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                          | <b>5</b>  |
| 2.1. Tratamento periodontal não-cirúrgico .....               | 5         |
| 2.2. Antimicrobianos de uso local em Periodontia .....        | 8         |
| 2.2.1. Iodo .....                                             | 8         |
| 2.2.2. Clorexidina .....                                      | 13        |
| 2.3. Terapia fotodinâmica.....                                | 22        |
| 2.3.1. Histórico .....                                        | 23        |
| 2.3.2. Mecanismos de ação da TFD .....                        | 24        |
| 2.3.3. Fontes de luz .....                                    | 27        |
| 2.3.4. Fotossensibilizador .....                              | 29        |
| 2.3.5. TFD em Odontologia .....                               | 31        |
| 2.3.6. Curcumina.....                                         | 33        |
| 2.3.7. TFD na Periodontia.....                                | 38        |
| <b>3. PROPOSIÇÃO .....</b>                                    | <b>47</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                             | <b>49</b> |
| 4.1. Animais.....                                             | 49        |
| 4.2. Sedação e anestesia .....                                | 49        |
| 4.3. Colocação das ligaduras .....                            | 49        |
| 4.4. Delineamento do estudo.....                              | 50        |
| 4.3. Sacrifício dos Animais e Processamento Histológico ..... | 54        |
| 4.4. Análise histométrica .....                               | 54        |

|           |                                                                             |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.      | Análise histoquímica para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) ..... | 56        |
| 4.6.      | Cultura dos microrganismos totais .....                                     | 56        |
| 4.7.      | Análise estatística.....                                                    | 57        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                      | <b>59</b> |
| <b>6.</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                      | <b>67</b> |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                      | <b>75</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                    | <b>77</b> |
|           | <b>ANEXO .....</b>                                                          | <b>99</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica causada inicialmente por bactérias periodontopatogênicas presentes no biofilme dental, podendo afetar indivíduos de todas as idades (Løe *et al.*, 1986). Essas bactérias atuam por meio de mecanismos diretos, causando destruição tecidual pela liberação de enzimas líticas e produtos citotóxicos, e indiretos, desencadeando as reações de defesa do hospedeiro que podem resultar em destruição progressiva da inserção conjuntiva e osso alveolar (Kinane & Lindhe, 1997).

Uma vez que a presença do biofilme é o fator etiológico primário envolvido no início e progressão da doença periodontal, sua remoção ou desorganização passa a ser o principal objetivo no tratamento da doença. Juntamente com a instrução de higiene oral e controle de placa, a raspagem e alisamento radicular (RAR) representa o principal passo no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal (Smulow *et al.*, 1983; Magnusson *et al.*, 1984). Os efeitos benéficos deste tipo de tratamento é o restabelecimento da saúde periodontal, tendo como resultado a redução do número de microrganismos subgengivais e a melhoria nos parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC), índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS) e supuração (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000).

No entanto, o uso isolado da terapia mecânica muitas vezes não é capaz de manter os níveis de microrganismos periodontopatogênicos baixos [*Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)] por períodos mais prolongados. Isso pode ser explicado pelo fato de que esses microrganismos podem ser inacessíveis através de intervenções mecânicas devido à sua capacidade de invadir o tecido periodontal ou túbulos dentinários ou porque eles se encontram em locais inacessíveis aos instrumentos periodontais. Esse pode ser o caso de bolsas periodontais profundas, concavidades na superfície radicular ou áreas de furca (Adriaens *et al.*, 1988; Addy, 1999; AAP, 2005; Del Peloso Ribeiro *et al.*, 2006). Além disso, sítios onde o tratamento foi bem sucedido podem

ser recolonizados por patógenos periodontais que persistem em superfícies não-dentais como o dorso da língua ou tonsilas (Lindhe *et al.*, 1999).

Dessa forma, tem sido proposta diferentes terapias coadjuvantes ao tratamento da RAR, como o uso de antibióticos sistêmicos ou locais no intuito de promover a redução ou eliminação dos patógenos periodontais (Drisko, 1996; Greenstein, 1999; Lopes *et al.*, 2010).

A terapia antibiótica sistêmica pode alcançar microrganismos em múltiplos sítios e atinge níveis variados de concentração por um longo período de tempo em diferentes partes do corpo; porém, dentro da bolsa periodontal, é difícil conseguir concentrações efetivas dessas drogas antimicrobianas (Schlagenhauf *et al.*, 1990). Além disso, a administração sistêmica de antibióticos pode causar significativos efeitos colaterais, além de propiciar resistência bacteriana (Sherman *et al.*, 1990; Wainwright, 1998; Usacheva *et al.*, 2001).

Já a administração local de agentes antimicrobianos objetiva auxiliar o tratamento mecânico na redução dos patógenos periodontais, por atingir concentrações elevadas no sítio de ação e por não induzir os efeitos indesejáveis da terapia antibiótica via sistêmica (Etienne, 2003). Várias substâncias têm sido utilizadas na terapia antimicrobiana local, das quais pode-se destacar o PVP-I e o gluconato de clorexidina (Slots, 2002).

O PVP-I tem demonstrado atividade bactericida contra alguns periodontopatógenos, mesmo em um tempo de contato muito breve (Caufield *et al.*, 1987; Muller *et al.*, 1989; Higashitsutsumi *et al.*, 1993). Estudos clínicos têm demonstrado resultados favoráveis através da associação do PVP-I ao tratamento da doença periodontal crônica (Rosling *et al.*, 1986; Christersson *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 1993; Rosling *et al.*, 2001; Hoang *et al.*, 2003), quando utilizado como irrigante subgengival (Wolf *et al.*, 1989; Leonhardt *et al.*, 2006) e em pacientes com periodontite recorrente (Collins *et al.*, 1993). O PVP-I tem como características a não indução de resistência bacteriana, a baixa toxicidade sistêmica, a fácil utilização e o baixo custo (Kunisada *et al.*, 1997; Lanker-Klossner *et al.*, 1997). Além disso, é um microbicida de amplo espectro para bactérias

gram-positivas e gram-negativas, fungos, micobactérias, clamídias, vírus e protozoários (Kawana *et al.*, 1997; Schreier *et al.*, 1997). No entanto, alguns estudos têm mostrado que o PVP-I pode causar alterações como manchamento dos dentes ou outros tecidos bucais (Clark *et al.*, 1989; Greenstein, 1999).

A clorexidina, um dos antimicrobianos mais estudados, é uma potente substância antibacteriana, que tem ação sobre uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de ser eficaz também contra alguns fungos, leveduras e vírus (Lindhe *et al.*, 1999). No entanto, apesar das excelentes propriedades inibidoras do biofilme, o uso amplo e prolongado da CLX é limitado pelos efeitos colaterais locais. Dentre esses efeitos, pode-se destacar: sabor amargo, manchas acastanhadas nos dentes, em alguns materiais restauradores e no dorso da língua e alteração do paladar (Pratten *et al.*, 1998). Além disso, alguns estudos não mostram uma ação pouco efetiva da clorexidina sobre um biofilme já formado (Zaura-Arite *et al.*, 2001; Zanatta *et al.*, 2007).

Nesse contexto, no intuito de driblar as limitações do uso de antimicrobianos sistêmicos e locais, novas terapias visando a redução bacteriana, tais como a terapia fotodinâmica, pode ser uma alternativa ao uso desses fármacos como coadjuvante à terapia periodontal não cirúrgica (Yamada *et al.*, 2004; De Almeida *et al.*, 2007).

A TFD consiste na associação de um fotossensibilizador exógeno e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar a morte bacteriana através de danos à membrana celular (Wilson *et al.*, 1995; Soukos *et al.*, 1996; Dortbudak *et al.*, 2001). A terapia fotodinâmica além de eliminar bactérias, tem ação também sobre fungos, vírus e protozoários (Wainwright & Crossley, 2004).

As vantagens da TFD antimicrobiana em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais são: 1) eliminação rápida da célula bacteriana, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os antibióticos; 2) a morte celular mediada pela liberação por radicais livres, que torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável; 3) terapia

confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação, já que o uso do fotossensibilizador ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias (Wilson, 2004; Allison *et al.*, 2005, 2006; Konopka *et al.*, 2007).

Sendo assim, diante dos benefícios observados com a terapia fotodinâmica na redução da carga microbiana, o objetivo deste trabalho é realizar um estudo microbiológico, histométrico e histoquímico avaliando o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica nos tecidos periodontais acometidos por doença periodontal experimental induzida em ratos, comparando-a com a clorexidina a 0,12% e o iodo povidine a 10%.



## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tratamento periodontal não-cirúrgico

Sabe-se hoje que por volta de 600 espécies bacterianas já foram isoladas e identificadas na cavidade bucal, entretanto poucas são as que desempenham papel importante na patogenia da doença periodontal (Socransky & Haffajee, 2002). Socransky *et al.* (1998) avaliaram a prevalência e a incidência de 40 espécies na placa supra e subgengival microbianas em 27 indivíduos com periodonto sadio e em 115 indivíduos através da técnica hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Concluíram que nos sítios doentes, houve maior proporção de bactérias do chamado complexo vermelho, composto pela *Pg*, *Td* e *Tf* e que quanto maior a severidade da doença, ou seja, quanto maior a profundidade da bolsa, maior a prevalência dessas espécies microbianas.

Em vista disso, a remoção regular e meticulosa do biofilme bacteriano por técnicas de higiene oral adequadas e raspagem e alisamento radicular, representa um ponto fundamental na manutenção da saúde periodontal. Muitos estudos têm demonstrado a importância clínica do controle regular do biofilme supragengival (Løe *et al.*, 1965; Nyman *et al.*, 1975; Lindhe & Nyman, 1975; Rosling *et al.*, 1976a; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000). Após a realização destes procedimentos são observados: redução da inflamação clínica, mudança para uma microbiota menos patogênica, redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica (Lindhe *et al.*, 1984; Ramfjord *et al.*, 1987; Kaldahl *et al.*, 1996).

Smulow *et al.* (1983) avaliaram o efeito do controle supragengival relacionado ao número de microrganismos anaeróbios em bolsas profundas e observaram uma redução no número desses microorganismos, quando realizada profilaxia diária dos depósitos supragengivais. Magnusson *et al.* (1984) relataram que um controle metucioso do biofilme supragengival está associado a uma melhora nos parâmetros clínicos (IP, SS e PS). Entretanto, com a presença de

biofilme supragengival observou-se uma rápida recolonização microbiana dos sítios tratados.

Baderstein *et al.* (1984) estudaram os efeitos do tratamento mecânico de bolsas periodontais associado às medidas de higiene oral em pacientes com doença periodontal avançada. Os índices de placa e sangramento foram reduzidos para menos de 20%, independente da profundidade de bolsa inicial. A redução na profundidade de bolsa foi causada por uma combinação do aumento da recessão gengival e ganho do nível de inserção clínica e os sítios com maiores profundidades iniciais foram os que apresentaram maiores ganhos de inserção.

No entanto, embora a RAR associada aos corretos métodos de higiene oral seja a terapia padrão para o tratamento da doença periodontal (Axellson & Lindhe, 1978; Baderstein *et al.*, 1981), estudos longitudinais têm relatado que, alguns pacientes que receberam tratamento periodontal não-cirúrgico, mesmo sob manutenção periodontal, apresentaram persistência ou a recidiva de crescimento de certos microrganismos em alguns sítios (Lang *et al.*, 1996; Lindhe *et al.*, 1999; Serino *et al.*, 2001). A persistência de certos microrganismos nas bolsas periodontais, como *Aa*, *Fn*, *Pi* e principalmente bactérias pertencentes ao complexo vermelho como *Pg*, *Tf* e *Td*, mesmo após o tratamento mecânico, tem sido apontado como fator de risco para a reinfecção desses sítios (Haffajje *et al.*, 1997; Chaves *et al.*, 2000; Mombelli *et al.*, 2000).

A capacidade dos microrganismos em recolonizar os sítios mesmo após o tratamento mecânico tem sido descritos na literatura como um dos pontos de insucesso da terapia periodontal (Adriaens *et al.*, 1988). A habilidade dos microrganismos em penetrar nos túbulos dentinários e na intimidade dos tecidos, pode agir como um reservatório desses patógenos e, dessa forma, reativar a doença (Christersson *et al.*, 1987). Outros sítios, como língua, bochecha e tonsilas também têm sido descritos como possíveis fontes para recolonização das bolsas após o tratamento mecânico (Adriaens *et al.*, 1988).

Além disso, outro fator associado ao fracasso da terapia mecânica não-cirúrgica é a inacessibilidade dos instrumentos manuais no fundo dos defeitos

periodontais. Por consequência, isso leva à remoção incompleta de biofilme e cálculo (Stambaugh *et al.*, 1981; Oda *et al.*, 2004), bem como a correlação direta entre a profundidade de bolsa e a quantidade de biofilme residual (Rabbani *et al.*, 1981; Rateitschak-Pluss *et al.*, 1992). Waerhaug (1978), examinou a porcentagem de remoção de biofilme e cálculo em 212 superfícies de 53 dentes indicados para extração. A taxa de sucesso foi de 83% das superfícies em bolsas  $\leq 3$ mm, 39% das superfícies em bolsas de profundidade entre 3 a 5 mm e apenas em 11 % das superfícies em bolsas  $> 5$ mm.

Esse problema torna-se ainda mais crítico quando se refere aos dentes posteriores e lesões de bi ou trifurcação. A dificuldade de instrumentação nessas áreas se deve à sua complexa anatomia, com presença de concavidades, convexidades e diferentes tamanhos de entrada da furca, além das projeções cervicais de esmalte (Svardstrom & Wennstrom, 2000). Não obstante, a literatura tem relatado maior quantidade de cálculo residual em furcas tratadas pela terapia periodontal não-cirúrgica (Matia *et al.*, 1986; Fleischer *et al.*, 1989; Parashis *et al.*, 1993).

Diante disso, esses achados têm suportado o uso de antimicrobianos, tanto locais quanto sistêmicos, como adjuntos ao tratamento mecânico, com o objetivo de suprimir ou reduzir a quantidade de patógenos e dessa forma trazer benefícios adicionais à terapia convencional (Quirynen *et al.*, 2002; Slots, 2002).

O uso de antibióticos sistêmicos associados ao tratamento da periodontite crônica não tem mostrado resultados consistentes (Herrera *et al.*, 2002; Haffajee *et al.*, 2003), na medida em que, ainda não é possível determinar qual fármaco é o mais efetivo em cada paciente e, ainda, a administração indiscriminada pode interferir na microbiota normal do organismo, gerar resistência e causar reações adversas (Walker, 1996; Roberts, 2002; Bidault *et al.*, 2007). Já os antibióticos de ação local oferecem abordagem específica para o tratamento da doença periodontal, na qual a droga em altas concentrações é aplicada no sítio específico, evitando reações adversas potenciais inerentes ao tratamento sistêmico (Ettiene, 2003; Mombelli & Samaranayake, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005).

## **2.2. Antimicrobianos de uso local em Periodontia**

O uso local das substâncias antimicrobianas tem sido preconizado durante o tratamento periodontal com a finalidade de combater os efeitos indesejáveis dos agentes sistêmicos, por agir diretamente nas bactérias que residem no tecido mole da bolsa periodontal, no cemento e na dentina radicular exposta, suprimindo ou erradicando a microbiota patogênica ou, ainda, modulando a resposta inflamatória, limitando, dessa forma, a destruição tecidual (Goodson, 1989).

Killooy (2002) avaliou vários aspectos inerentes ao tratamento periodontal, entre eles, quantidade de bolsas residuais, ganho de inserção clínica, porcentagem de sítios que necessitavam terapia adicional, além de outros itens, como tempo e custo. Concluiu que os antimicrobianos de ação local ofereciam benefícios tanto estatísticos como clínicos como opção adicional à terapia periodontal.

Em revisão sistemática, Hannes & Purvis (2003), após avaliarem 32 estudos (envolvendo ao todo 3705 indivíduos), afirmaram que o uso dos antimicrobianos locais associados à RAR ofereceu maiores benefícios comparados à RAR isoladamente e que em algumas populações o uso dos fármacos como monoterapia mostrou resultados semelhantes.

Dentre as formas de utilização dos antimicrobianos locais pode se encontrar agentes de irrigação, géis, pomadas e até dispositivos de liberação prolongada contendo a droga. Como agentes de irrigação, o iodo povidine e a clorexidina destacam-se por apresentar bons resultados na redução microbiana (Slots, 2002; Mombelli *et al.*, 2005).

### **2.2.1. IODO**

O iodo foi descoberto em 1811 pelo químico Bernard Courtois; entretanto seu efeito bactericida foi descrito por Davaine somente em 1880 (Fleischer & Reimer, 1997). O iodo, do grego *ioeides*, significa “de cor violeta” devido a esta intensa coloração presente em seus vapores. Inicialmente, a aplicação clínica do

iodo era sob a forma de iodofórmio ou tintura de iodo etílico, mas sua utilização era limitada porque o antisséptico não possuía estabilidade, manchava, além de causar irritações na pele e mucosas. Foi após o desenvolvimento dos iodóforos (iodo ligado a macromoléculas) que começou seu uso em larga escala, em virtude da diminuição da sua toxicidade para os tecidos humanos (Fleischer & Reimer, 1997).

O PVP-I é classificado pela farmacopéia britânica como um iodóforo, que é um complexo de iodo fracamente ligado a um elemento transportador. As substâncias transportadoras são polímeros neutros com propriedades anfipáticas cujas funções são aumentar a solubilidade do iodo e diminuir a sua toxicidade. Nesse caso, a molécula carreadora é a polivinilpirrolidona (povidona) e o iodo está ligado a ela por pontes de hidrogênio (Maruniak *et al.*, 1992; Fleischer & Reimer, 1997).

Em solução aquosa existe um equilíbrio entre a quantidade de iodo ligado ao polímero e o iodo livre. Isso faz com que exista um reservatório de liberação de iodo (Gennaro, 1990; Schreier *et al.*, 1997). A maioria das soluções disponíveis no mercado contém aproximadamente 10% do iodo ligado e 1% de iodo livre. Assim, o iodo disponível equivalente pode ser calculado dividindo-se a concentração de PVP-I por 10. Por exemplo, PVP-I (10%) contém na realidade 1% de iodo livre (Gennaro, 1990; Greenstein, 1999).

O PVP-I tem ação em bactérias gram-positivas e gram-negativas, esporos, fungos, vírus e protozoários, demonstrando um amplo espectro de ação (Schaecken *et al.*, 1984; Fleischer & Reimer, 1997; Schreier *et al.*, 1997; Spratt *et al.*, 2001). Quimicamente, a atividade bactericida do PVP-I ocorre através dos grupamentos amino (NH-), tiol (SH-) e hidroxílicos (OH-) dos aminoácidos e nucleotídeos (Kawana *et al.*, 1997; Schereier *et al.*, 1997).

Apesar do mecanismo químico de ação do PVP-I já estar estabelecido, Schereier *et al.* (1997), observaram através de análises bioquímicas e de microscopia eletrônica, que a interação do PVP-I com a parede celular de microrganismos causa provavelmente a formação de um poro transiente ou

permanente. Especula-se que, em razão da oxidação das duplas ligações na fração fosfolipídica da parede celular, possam ser geradas interfaces sólido-líquidas na membrana lipídica, levando à perda de material citoplasmático, além da desnaturação de enzimas pelo contado direto com o iodo.

König *et al.* (1997) confirmaram a alta atividade bactericida do PVP-I e ressaltaram que, ao contrário do que acontece com muitos antimicrobianos, o PVP-I inibe a ação de fatores de virulência como exotoxinas e endotoxinas. Isso corrobora com os achados de desnaturação enzimática observados por Schreier *et al.* (1997) quando da utilização do PVP-I.

O efeito na parede celular e a rápida destruição celular, ao contrário dos antimicrobianos que normalmente interferem com processos bioquímicos, são motivos que explicam porque a exposição de curta ou longa duração ao PVP-I não resultam em aumento da resistência bacteriana (Lanker-Klossner *et al.*, 1997; Slots, 2002). Soma-se a isso o fato de que a resistência das bactérias aos antibióticos não influenciam a sensibilidade bacteriana ao PVP-I (Kunisada *et al.*, 1997; Michel & Zach, 1997).

Além disso, vale salientar também que o PVP-I tem baixo custo e é de fácil aquisição. Reação alérgica ao PVP-I é rara, de maneira que Pohl-Markl *et al.* (1988) em uma população de 6.050 pacientes submetidos ao teste alérgico, observaram apenas 0,73% com reações ao iodo povidine. Com relação à toxicidade, não existem relatos de alteração da cicatrização das mucosas ou pele e também de reações teciduais após o uso intra-oral de PVP-I (Forabosco *et al.*, 1996; Rahn *et al.*, 1995). No entanto, apesar da baixa toxicidade, a utilização do PVP-I tem sido contra-indicada em pacientes com alterações na função da tireóide, com hipersensibilidade ao iodo e em mulheres grávidas ou em período de lactação (Fleischer & Reimer, 1997; Nobukuni *et al.*, 1997; Linder *et al.*, 1998; Greenstein, 1999; Slots, 2002).

Devido a todas essas características apresentadas (ação bactericida rápida, amplo espectro de ação, fácil utilização, não indução de resistência bacteriana) o iodo povidine torna-se um promissor antimicrobiano para a Periodontia (Quirynen

*et al.*, 2002) . O uso de PVP-I na área da Periodontia se iniciou em meados de 1980 e desde então alguns trabalhos têm sido desenvolvidos avaliando o efeito do PVP-I puro ou associado a outras substâncias na prevenção de gengivite bem como sua utilização adjunta ao tratamento periodontal não-cirúrgico. Alguns estudos têm avaliado *in vitro* e *in vivo* o efeito do PVP-I em diferentes concentrações, sobre diversos microorganismos subgengivais (Berkelman *et al.*, 1982; Caufield *et al.*, 1987; Higashitsutsumi *et al.*, 1993; Kunisada *et al.*, 1997).

Caufield *et al.* (1987), na tentativa de simular as condições subgengivais, desenvolveram uma técnica para cultivar bactérias sobre membranas que proporcionam uma espessura de  $10^8$  bactérias. Os autores relataram que o iodo apresentou a menor concentração mínima inibitória em cinco minutos, quando comparado à clorexidina, ao fluoreto de sódio e ao fluoreto estanhoso. Essa concentração era 0,25% para *Pg* e 0,5% para *Aa*, *Pi* e *Fn*.

Nakagawa *et al.* (1990) analisaram *in vivo* o efeito de uma solução comercial de PVP-I 10% não diluída e duas diluições dessa solução (10% e 20%), utilizadas para irrigação subgengival de bolsas periodontais. Apenas a solução comercial não diluída apresentou redução estatisticamente significativa na formação de colônias bacterianas, quando comparada ao grupo controle (irrigação com solução de NaCl 0,9%).

Maruniak *et al.*, (1992) avaliaram o efeito de 4 soluções antissépticas para bochechos: timol (Listerine<sup>®</sup>), clorexidina a 0,12% (Peridex<sup>®</sup>), PVP-I + peróxido de hidrogênio (Perimed<sup>®</sup>) e água (controle) no desenvolvimento do biofilme dental e gengivite, quando usados como único método de higiene bucal por 14 dias, 2 vezes ao dia. O estudo concluiu que Perimed<sup>®</sup> usado 2 vezes ao dia em bochechos é tão eficiente quanto Peridex<sup>®</sup> na redução dos níveis de placa e gengivite e superior ao Listerine<sup>®</sup> e a água.

Higashitsutsumi *et al.* (1993) avaliaram “*in vitro*” a ação de uma solução de iodo povidine a 10% diluída 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 12800 vezes, em diferentes períodos de ação (15, 30 e 60 segundos), sobre sete tipos de periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,

*Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatbacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ssp*, *Pseudomonas aeruginosa*). Os resultados mostraram que a diluição de 400 vezes, em contato com o meio de cultura por 15 segundos, obteve o melhor efeito bactericida.

Von Ohler *et al.*, (1998) avaliaram a eficácia da irrigação subgengival com PVP-I 0,5%, clorexidina 0,2% e solução salina 0,9% de 64 bolsas periodontais (5-11mm) na vitalidade microbiana, observada através das técnicas de microscopia de campo escuro e marcação fluorescente. Foram realizadas coletas previamente ao procedimento de irrigação 0h, 1h, 24h, 7 dias e 31 dias após. Não foi realizada instrumentação subgengival em nenhum momento do estudo. Alguns sítios não receberam irrigação e serviram como controle. Os resultados mostraram que, após sete dias, apenas os grupos tratados com clorexidina e iodo exibiam redução na vitalidade microbiana (PVP-I 35-80% e CLX 30-80%) e após 31 dias apenas o grupo que recebeu PVP-I ainda mostrava redução na contagem de bactérias viáveis (12-90%).

Hoang *et al.* (2003), mostrou que a irrigação subgengival com PVP-I a 10%, associada à RAR, foi capaz de reduzir em mais de 95% a quantidade de periodontopatógenos de 44% dos sítios com PS  $\geq$  6mm. Essa redução ocorreu 5 semanas após o tratamento, mesmo em sítios com cálculo subgengival presente (comprovados radiograficamente). Entretanto, apenas a RAR ou a irrigação com PVP-I ou a irrigação com água levaram a uma redução de 95% dos periodontopatógenos em somente 13% dos sítios avaliados. Assim, os autores concluíram que a aplicação subgengival de PVP-I ajudou na redução dos níveis de periodontopatógenos. Entretanto, ela deve estar associada à instrumentação mecânica em bolsas profundas ou sítios com cálculo subgengival.

Oliveira *et al.*, (2009) avaliaram o efeito de diversas concentrações de PVP-I sobre amostras microbiológicas de biofilme subgengival. Essas amostras foram coletadas de bolsa periodontal, colocadas em meio de cultura líquido BHI pré-reduzido (*Brain Heart Infusion*) e replicadas em placas de ágar-sangue contendo discos imersos em: solução salina a 0,9%, digluconato de clorexidina a 0,12%,



PVP-I a 10% puro, PVP-I a 10% na proporção de 1:1, PVP-I a 10% na proporção de 1:3. A solução salina não apresentou efeito inibitório no crescimento bacteriano. O grupo contendo clorexidina apresentou o maior halo de inibição, evidenciando diferença estatística em relação aos outros grupos. O grupo contendo iodo puro apresentou um halo estatisticamente semelhante ao grupo iodo 1:1. Estes, porém, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo iodo 1:3, que tinha halo de inibição de apenas 3mm. Sendo assim, os autores concluíram que o iodo a 10% puro apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre microrganismos do biofilme subgengival de maneira semelhante ao iodo 1:1, porém inferior ao digluconato de clorexidina a 0,12%.

Krück *et al.* (2012) em um estudo randomizado avaliaram, após 12 meses, o impacto no resultado do tratamento periodontal não-cirúrgico associado à irrigação subgengival com diferentes solução irrigadoras (cloreto de sódio a 0,9%, digluconato de clorexidina a 0,12% ou iodo-povidine a 7,5%). Antes da raspagem e após 3 e 12 meses, os seguintes parâmetros foram registrados: profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem. Amostras de biofilme subgengival foram analisadas para *Aa*, *Pg*, *Tf* e *Td*. Após 12 meses houve uma melhora significativa em todos os parâmetros avaliados. Nenhuma diferença significativa foi vista entre os grupos em todos os sítios, inclusive aqueles que apresentavam profundidade de sondagem de 3 a 6mm no *baseline*, embora o grupo do PVP-I teve as maiores melhoras clínicas. As contagens de *Aa* e *Pg* foram significativamente reduzidas após 12 meses usando PVP-I. Diferenças significativas entre os grupos foram vistas após 3 meses para *Aa* e *Pg* e após 12 meses para *Tf*. Nenhuma diferença foi vista entre os grupos nos resultados clínicos após 12 meses. Em relação aos resultados microbiológicos, um leve benefício pareceu derivar do uso do PVP-I.

Sendo assim, de acordo com os trabalhos apresentados, pode-se afirmar que o PVP-I, se corretamente utilizado e nas concentrações usuais (9-12%), apresenta-se como uma substância antimicrobiana segura (Maruniak *et al.*, 1992; Niedner, 1997).

### **2.2.2. CLOREXIDINA**

A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (Davies *et al.*, 1954). Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrócloro e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. A CLX possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Tortora *et al.*, 2000).

Além disso, a clorexidina é estável, não é tóxica aos tecidos, a absorção pela mucosa e pele é mínima, é bem tolerada quando administrada em animais via parenteral e intravenosa, parece não atravessar a barreira placentária e não provoca efeitos tóxicos colaterais sistêmicos com o uso prolongado (Davies & Hull, 1973; Winrow, 1973; Loe *et al.*, 1976; Case, 1977; Rushton, 1977).

O uso da CLX em odontologia foi inicialmente designado para desinfecção pré-cirúrgica da boca e em endodontia. Todavia, atualmente vem sendo utilizada como adjuvante da higiene bucal mecânica, durante o tratamento periodontal, antes de procedimentos orais cirúrgicos, após exodontias, para a redução do número de bactérias da saliva em pacientes física ou mentalmente incapacitados, nas candidoses bucais, em pacientes sob uso de aparelhos ortodônticos ou em pacientes com alto risco de cárie, sendo considerada como substância “padrão-ouro” no controle do biofilme dental (Moreira *et al.*, 2008).

Na boca, devido à sua natureza dicatiônica, a CLX adsorve-se imediatamente a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (Gjerme *et al.*, 1974; Bonesvoll *et al.*, 1974; Rölla & Melsen, 1975). Assim, sugere-se que uma extremidade catiônica da molécula se prende à película dental, que apresenta carga negativa, e a outra extremidade catiônica fica livre para interagir com bactérias que buscam colonizar o dente. Em baixa

concentração essa forte ligação às membranas das células bacterianas, resulta no aumento da permeabilidade com perda dos componentes intracelulares, inclusive potássio (Hugo & Longworth, 1964). Em alta concentração, a CLX causa precipitação do citoplasma bacteriano e morte celular (Hugo & Longworth, 1966).

Uma vez adsorvida, inicialmente, a CLX quando aplicada na forma de solução, gel ou verniz, atua como bactericida. Depois desse efeito bactericida inicial, ela se liga às mucosas e superfícies dos dentes e, posteriormente, é liberada de forma lenta, em concentrações bacteriostáticas, durante várias horas (Schjott *et al.*, 1970; Fejerskov & Kidd, 2005; Van Strydonck *et al.*, 2005). Essa capacidade de continuar sua ação antimicrobiana mesmo depois de um tempo em que foi aplicada (substatividade), é o que torna a CLX diferente dos demais agentes antimicrobianos (Rosa & Rocha, 1993; Matthijs & Adriaens, 2002; Zanatta & Kuchenbecker, 2007).

Sinnes *et al.* (1997) afirmam que em cada bochecho feito, 3% da CLX é deglutida, 67% é expectorada e 30% fica retida na boca. Essa hipótese foi testada por Bonesvoll & Gjermo (1978) que compararam a capacidade de retenção da CLX e de compostos quaternários de amônia, os quais compartilham a mesma carga positiva em sua molécula. A quantidade de composto quaternário de amônia retido na cavidade bucal inicialmente foi de 65% contra 32% de CLX, mostrando que num primeiro momento, a concentração salivar dos compostos de amônia foi maior do que a concentração de CLX. Por outro lado, esta concentração declinou mais rapidamente, uma vez que, após 4 horas da utilização das substâncias, a concentração de CLX era significativamente maior. A natureza monocatiônica da amônia e dicatiônica da CLX foram então sugeridas como plausibilidade biológica que explicava a retenção mais prolongada dessa última, a despeito de inicialmente apresentar menor quantidade retida.

A inibição do biofilme pelos enxaguatórios de CLX parece estar relacionada à dose (Cancro *et al.*, 1973; Jenkins *et al.*, 1994). Durante algum tempo a forma mais usualmente utilizada da CLX era por meio de bochechos, realizados duas vezes ao dia, utilizando 10ml de uma solução a 0,2%. Estudos posteriores

mostraram que, diminuindo a concentração do produto e aumentando o volume da solução, a quantidade de droga usada era praticamente a mesma e a efetividade antiplaca mantém-se semelhante, com redução dos efeitos colaterais (Keijser *et al.*, 2003). Assim, a concentração a 0,12% com bochechos de 15ml passou a ser empregada em larga escala (Zanatta & Rösing, 2007).

Inúmeros trabalhos já foram realizados e comprovaram a efetividade antimicrobiana da CLX no tratamento da gengivite e na inibição da recolonização da placa bacteriana, demonstrando uma redução que varia, respectivamente, de aproximadamente 50-55% e 45% para biofilme supragengival e gengivite, quando comparada com soluções controle (Løe & Schiott, 1970; Bassiouny & Grant., 1975; Løe *et al.*, 1976; Addy & Moran, 1983; Briner *et al.*, 1986; Segreto *et al.*, 1986; Sinnes, 1997; Cury *et al.*, 2000).

A inibição da placa pela CLX foi primeiramente investigada em 1969, por Schroeder, mas o estudo definitivo foi realizado em 1970 por Løe & Schiott. Esse estudo mostrou que o enxágüe por 60 segundos duas vezes ao dia com 10ml a 0,2% de solução de gluconato de clorexidina, na ausência da limpeza normal dos dentes, inibia a reprodução do biofilme e o desenvolvimento da gengivite.

Løe (1973) e Briner *et al.* (1986), em seus trabalhos clínicos, provaram que com o uso repetido da solução de CLX, o número de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos na saliva foi reduzido em 80-90%. Com o uso prolongado, o número de microrganismos salivares (aeróbicos, anaeróbicos e estreptococos) diminuiu em 50 a 90% e nenhum crescimento de leveduras foi encontrado, demonstrando que a CLX mostrou também uma potente atividade fungicida na cavidade oral.

Addy & Wright (1978), em um estudo clínico e laboratorial compararam a atividade antibacteriana de dois enxaguatórios antissépticos: PVP-I a 1% e gluconato de clorexidina a 0,2%. No grupo que realizou o bochecho com o PVP-I observou-se uma redução imediata na quantidade total de bactérias aeróbias e anaeróbias, seguida de uma recolonização aos níveis normais após 1hr do bochecho com o antisséptico. No grupo da CLX houve uma redução um pouco maior na contagem bacteriana salivar, o que permaneceu até 7hr após o

bochecho. *In vitro*, amostras da saliva obtidas dos indivíduos após 2 minutos do bochecho com PVP-I produziu pouca ou nenhuma inibição do crescimento bacteriano, enquanto que com a CLX, a atividade antibacteriana permaneceu na saliva até 3hr depois da coleta da amostra. Os autores concluíram que o PVP-I como enxaguatório exerce apenas um efeito antibacteriano imediato e, ao contrário da CLX, não retém um nível antibacteriano dentro da cavidade oral após expectoração.

Sekino *et al.* (2004), executaram um experimento clínico, duplo cego e cruzado para avaliar o efeito da CLX no padrão de formação do biofilme como coadjuvante dos meios mecânicos de higiene bucal, utilizando bochechos e gargarejos de CLX a 0,2% e gel de clorexidina a 1% no dorso da língua. Os resultados indicaram que houve retardo na formação do biofilme e diminuição na carga bacteriana total das superfícies dentais e da saliva. Contudo, após a suspensão do regime de utilização do antimicrobiano, nova estrutura de microrganismos se restabelecia num curto período de quatro dias.

Entretanto, muitos dos trabalhos que avaliaram clinicamente a ação da CLX em prevenir o desenvolvimento de gengivite utilizaram na metodologia uma deplacagem inicial, previamente ao início do período de uso do antisséptico. Tal metodologia, no entanto, não identifica claramente a efetividade da CLX sobre um biofilme previamente formado (Løe & Schiott, 1970; Addy & Moran, 1983; Løe *et al.*, 1976; Segreto *et al.*, 1986).

Brownstein *et al.* (1990) por meio de um modelo de boca dividida, analisaram a efetividade da clorexidina 0,12% utilizada sob a forma de bochechos em pacientes com gengivite presente. Todos os participantes receberam uma profilaxia prévia em apenas metade da boca antes do início do estudo. Entre os resultados encontrados pelos autores após dois meses de uso das soluções está o de que a CLX a 0,12% reduziu significativamente a média do índice gengival, percentagem de sangramento gengival, bem como o sangramento à sondagem apenas nas superfícies deplacadas no início do estudo, mostrando a dificuldade de ação do antisséptico em superfícies com biofilme presente.

Zaura-Arite *et al.* (2001) verificaram pela primeira vez o comportamento do biofilme oral após exposição a uma solução de clorexidina 0,2% utilizando a microscopia a laser confocal. Foram avaliados 6 indivíduos saudáveis, divididos em leves formadores de biofilme e pesados formadores de biofilme que usaram discos de dentina bovina em um dispositivo *in situ* onde houve crescimento do biofilme sem que houvesse sua ruptura. Foram expostos a uma solução de CLX a 0,2% os biofilmes que se formaram em 6, 24 e 48 horas. A análise estrutural do biofilme mostrou que à medida que decorriam as horas de exposição, maior foi a complexidade estrutural do biofilme. Assim, os biofilmes mostraram uma espessura média de 10, 27 e 34µm para 6, 24 e 48 horas, respectivamente. Apesar dos biofilmes terem sido expostos a apenas uma aplicação de CLX e essa ter sido aplicada fora da boca, os autores concluíram que o biofilme de 6 horas em leves formadores de placa apresentou a mais baixa viabilidade bacteriana e, com o aumento das horas, as diferenças entre a viabilidade bacteriana desapareceram entre os formadores de placa leves e pesados. A análise em camadas mostrou que a camada mais externa do biofilme apresentou, estatisticamente, menor viabilidade bacteriana que a camada mais interna, tanto em 24 quanto em 48 horas, deixando clara a ineficácia da clorexidina nas camadas mais internas de biofilme com mais de 24 horas de formação.

Zanatta *et al.* (2007) realizaram um ensaio clínico randomizado, cego, com delineamento de boca dividida para comparar o efeito da clorexidina em superfícies com presença e ausência de biofilme supragengival. Foram avaliados 20 participantes que após 96 horas de acúmulo de biofilme tiveram 2 quadrantes randomicamente selecionados para a remoção mecânica do biofilme enquanto nos outros 2 não foi realizada intervenção. Após, teve início o período de bochechos com CLX a 0,12% por 21 dias, permanecendo na ausência de controle mecânico. Foram avaliados índice de placa de Quigley & Hein, índice gengival, fluido gengival, índice de manchamento e a presença de cálculo. Os resultados encontrados nas comparações intergrupos mostraram que a variação da resposta inflamatória entre os diferentes tempos experimentais revelou que as superfícies

com biofilme presente mostraram variações do índice gengival maiores que as superfícies sem placa ( $0.21 \pm 0.02$  para  $0.93 \pm 0.03$  *versus*  $0.18 \pm 0.01$  para  $0.52 \pm 0.03$ ) bem como o volume de fluido gengival ( $48.09$  para  $94.28 \mu\text{L}$  *versus*  $46.94$  para  $64.99 \mu\text{L}$ ). Ainda, as comparações intergrupos também mostraram médias estatisticamente maiores de severidade e extensão de manchamento bem como de presença de cálculo nas superfícies com placa presente comparadas às superfícies sem placa. Desta forma, os autores concluíram que a CLX a 0,12% apresenta menor efeito antiplaca e antigengivite em superfícies com biofilme presente. Ainda, os efeitos adversos de formação de cálculo e manchamento são maiores em superfícies com biofilme. A leitura clínica desta evidência reforça a necessidade de remoção do biofilme supragengival antes do uso da CLX a 0,12%.

Além desses trabalhos relatados, alguns estudos relatam menores benefícios clínicos após o uso subgengival da clorexidina e como adjuvante à raspagem e alisamento radicular, não apresentando benefícios adicionais a essa terapia (Cumming & Løe, 1973; Brownstein *et al.*, 1990).

Cumming & Løe (1973), sabendo dos benefícios clínicos do bochecho de clorexidina, iniciaram os estudos da clorexidina como solução irrigadora subgengival. O uso da clorexidina como solução irrigadora subgengival apresentou resultados controversos e efeito limitado, o que pode ter ocorrido pelo curto tempo de contato da substância com a superfície radicular e provável redução da substantividade.

A ineficácia da clorexidina na área subgengival pode ser explicada pela baixa substantividade subgengival deste fármaco, qualquer que seja sua concentração (Stabholz *et al.*, 1993). Isso pode ser explicado pela fraca adesão do antimicrobiano à superfície radicular, resultando em níveis de concentrações subterapêuticas (Oosterwaal *et al.*, 1989). Além disso, a CLX tem elevada afinidade pelas proteínas salivares ou proteínas do soro e sangue, o que explica uma diminuição rápida da concentração na zona subgengival (Hjeljord *et al.*, 1973; Rølla & Melsen, 1975; Wade & Addy, 1989; Spijkervet *et al.*, 1990; Rabe & Hillier, 2000). Somado a isso, alguns microrganismos periodontais são apenas

moderadamente sensíveis a CLX (Slots *et al.*, 1991). Há alguma evidência de que a *Pg* libera vesículas que se ligam e inativam a CLX, protegendo-se da atividade bactericida (Grenier, 1996). Oosterwaal *et al.* (1991a; 1991b) referiram, no entanto, um aumento significativo de atividade antimicrobiana (redução de 99% dos periodontopatógenos) quando o produto foi aplicado repetidamente (porcentagem de clorexidina a 2, 3 vezes dentro de 10 min), mas o efeito adjuvante foi em breve desaparecido.

Schlagenhauf *et al.*, (1990), avaliaram o efeito da raspagem subgengival *versus* irrigação subgengival da bolsa periodontal com clorexidina a 0,1% ou solução salina (controle) na recolonização de sítios subgengivais com microrganismos associados à doença periodontal, após procedimento único de RAR. Adicionalmente, os seguintes parâmetros foram avaliados: NIC, IP e SS. Os resultados mostraram que os procedimentos de RAR iniciais levaram a uma melhora clínica e microbiológica significantes em todos os grupos experimentais. Baseado nas mudanças clínicas e microbiológicas observadas, a irrigação subgengival das bolsas periodontais em intervalos de 1 mês foi igualmente efetiva como a RAR realizados. Os autores concluíram então que o uso da CLX a 0,1% como irrigante não foi mais efetivo do que as soluções salinas utilizadas como controle nem trouxe benefícios adicionais ao tratamento da RAR.

Tseng & Newcomb (1991), investigaram o efeito adjunto da irrigação subgengival com CLX após RAR. Mudanças nos parâmetros clínicos e na composição microbiana da placa subgengival foram monitorados por microscopia de campo escuro em 12 pacientes por um período de 12 semanas. Dois sítios testes e dois sítios controles com PS variando entre 4 a 7mm foram selecionados em cada paciente. Instrução de higiene oral e uma sessão de RAR foram realizados. Além disso, os sítios testes foram irrigados com 1ml de solução de CLX a 0,2%, enquanto os sítios controles foram irrigados com solução salina ou não foram irrigados. Houve uma melhora significativa dos parâmetros clínicos com pouca diferença entre os sítios testes e controle. Entre o início e o fim do estudo houve uma acentuada redução na proporção de espiroquetas com um



concomitante aumento de microrganismos cocóides, com pequena diferença entre os sítios testes e controle. Os autores concluíram que a irrigação subgengival com uma aplicação única de clorexidina a 0,2% não aumentou a cicatrização gengival ou retardou a recolonização das bolsas para certos microrganismos, quando a RAR são realizados imediatamente antes da irrigação.

Outro fator a ser levado em consideração no uso regular de um antimicrobiano local é a sua toxicidade sistêmica. Até o momento, a CLX apresentou baixa evidência de toxicidade sistêmica em seres humanos, além de não produzir qualquer resistência apreciável dos microrganismos da boca e também não tem sido associada a quaisquer alterações teratogênicas (Carranza & Newman, 1997).

Løe (1973) revisou vários trabalhos com o uso prolongado da CLX (7 semanas, meio ano, 2 anos) mostrando que ocorreram mudanças mínimas e pouco visíveis na susceptibilidade dos microrganismos orais.

Schiott *et al.*, (1976), ao acompanharem a aplicação da CLX em pacientes por um período de dois anos, não detectaram mudança ou redistribuição da população microbiana salivar. O uso da clorexidina produziu redução na placa dental e gengivite sem alterar significativamente o ecossistema microbiano na saliva, levando-se em consideração os parâmetros do número de aeróbios, anaeróbios, estreptococos e microrganismos gram-negativos.

Lindhe (1999), relata que durante um estudo com 150 estudantes de Medicina, que usaram uma solução de digluconato de clorexidina a 0,2 % durante dois anos, diversos exames, como hemograma, exame de urina e velocidade de sedimentação, foram realizados em intervalos regulares e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e experimental para qualquer um dos parâmetros avaliados. Baseado nesses achados, o autor afirma que a clorexidina pode ser usada com segurança por períodos prolongados.

Em contrapartida, Flemigson *et al.*, (2008) examinaram *in vitro*, o efeito do Listerine®, da clorexidina a 0,2% e PVP-I a 1% sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos em cultura. Os fibroblastos gengivais foram cultivados e

incubados em meio contendo CLX, Listerine e PVP-I em várias concentrações (1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 100%) por 1, 5 e 15 minutos. Em todos os três grupos, a inibição da proliferação de fibroblastos foi dependente da concentração do enxaguatório em todas as células cultivadas, mas foi independente do tempo de exposição ao enxaguatório. Os resultados mostraram que todas as três soluções foram tóxicas para os fibroblastos, com a CLX sendo a mais citotóxica nas concentrações de 10%, 20% e 100% do que o Listerine e o PVP-I. Já nas concentrações diluídas de 1% e 2%, o Listerine mostrou-se mais citotóxico do que a CLX e o PVP-I.

Além disso, alguns efeitos colaterais locais são atribuídos ao uso oral prolongado, por mais de 14 dias, da CLX em enxaguatórios, como: manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e a interferência na sensação gustativa. Embora existam, no mercado consumidor, enxaguatórios com concentração de 0,2%, a utilização de produtos com clorexidina a 0,12% é mais indicada, pois, nessa concentração, são diminuídos os efeitos adversos das soluções mais concentradas, mantendo-se a eficácia contra os microrganismos (Pratten *et al.*, 1998).

Dessa forma, embora esta substância seja um excelente antimicrobiano, devido a seus efeitos colaterais locais, não é recomendado o seu uso prolongado (Gebara *et al.*, 1996). Além disso, devido à sua pouca penetrabilidade no tecido, o antisséptico é de valor limitado na terapia das condições orais estabelecidas, não trazendo benefícios adicionais à terapia periodontal convencional sendo mais valiosa no aspecto preventivo (Gjermeo *et al.*, 1974; Addy, 1986; Addy & Moran, 1997).

### **2.3. TERAPIA FOTODINÂMICA**

Tendo em vista os aspectos negativos relacionados ao uso dos antimicrobianos, a busca por novas terapias que possam oferecer uma alternativa

ao uso desses fármacos se torna necessária. Nesse contexto, A TFD figura como um método antimicrobiano promissor, com menos efeitos colaterais e sistêmicos (Chan & Lai, 2003; Soukos *et al*, 2003; Wainwright *et al*, 2004).

### **2.3.1. Histórico**

A TFD teve início há 4.000 anos com os egípcios, através da ingestão de plantas e luz solar, para tratar doenças como o vitiligo (Ackroyd *et al.*, 2001). Entretanto, a técnica começou a ser empregada com sistemática científica apenas no século XX. Em 1900, Oscar Raab e Von Tappeiner, constataram acidentalmente, durante um estudo da ação da acridina sobre culturas de paramécios, expostos a uma luz intensa (neste caso, os raios de uma tempestade), que estes microrganismos unicelulares morriam sob essas condições. Dessa forma, os autores descobriram a propriedade óptica de fluorescência e concluíram que não era a luz, mas sim alguns produtos da fluorescência que induziam a toxicidade *in vitro*. Após outros estudos, estes mesmos autores postularam que tal efeito era produto da transferência de energia da luz para a substância química. Em uma segunda publicação, Von Tappeiner concluiu que havia um grande potencial de aplicação de substâncias fluorescentes na medicina (Ackroyd *et al.*, 2001).

O primeiro relatório da administração parenteral de fotossensibilizador em humanos foi em 1900, por um neurologista francês, que usou eosina por via oral no tratamento da epilepsia. Esta descoberta conduziu então a primeira aplicação de uma interação entre um composto fluorescente e luz, na qual Von Tappeiner e Jesionek, utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição a uma luz branca para o tratamento de tumores de pele. Juntamente com Jodlbauer, Von Tappeiner demonstrou a presença de oxigênio nestas reações de fotossensibilização e em 1907 introduziram o termo Terapia Fotodinâmica, que foi definido como “o processo de fotossensibilização dependente do oxigênio” (Daniel & Hill, 1991; Torezan, 2000; Ackoyd *et al.*, 2001).

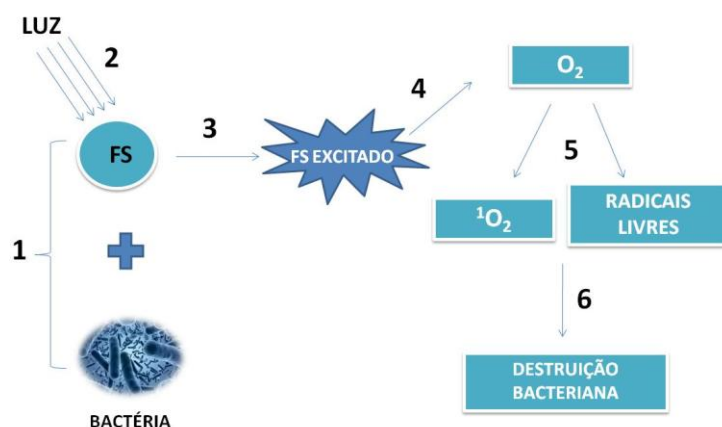
Na década de 60, Lipson investigou o acúmulo preferencial da hematoporfirina em tumores, implantados em camundongos e ratos e observou que a incidência de luz proporcionava regressão da doença. Como resultado desses estudos, no final daquela década, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama usando hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor, marcando assim, o início da TFD como terapia clínica para câncer. Na década de 70, os estudos se voltaram para utilização desta terapia em microrganismos (Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

A partir dos anos 90, vários estudos deixaram evidente o seu grande potencial no que concerne a outras moléstias (Levy, 1995; Weinstein *et al.*, 1991). Nesse rol incluem-se a psoríase, onde resultados muito promissores foram obtidos; degeneração macular da retina; condições autoimunes; arteriosclerose e restenose; remoção de verrugas na laringe (Ben-Hur *et al.*, 1993); tratamento de micoses oriundas de fungos (Wolf *et al.*, 1994) e destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos (Van der Meulen *et al.*, 1997; Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

A partir de 1992, Wilson *et al.*, utilizaram a terapia fotodinâmica em bactérias orais. E finalmente, a partir do ano 2000, estudos clínicos *in vivo* começaram a ser realizados para tratamento de cárie e biofilmes supra e subgengivais (Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

### **2.3.2. Mecanismos de ação da TFD**

A TFD é baseada no princípio que um fotossensibilizador liga-se à célula alvo e é ativado por uma luz com comprimento de onda específico. Nesta reação, ocorre a formação de oxigênio singleto e radicais livres, que são extremamente tóxicos para determinadas células e bactérias, podendo levar à morte celular ou destruição dos tecidos por necrose ou apoptose (Wainwright, 1998; Konopka & Golinski, 2007; Maisch, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de ação da TFD. Um fotossensibilizador (FS) se liga ao microrganismo (1) e após exposição à luz com comprimento de onda apropriado (2) torna-se ativado para um estado excitado (3). Em seguida, o FS transfere energia da luz para o oxigênio molecular (4) e gera oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e radicais livres (5) que são citotóxicos às células bacterianas (6). Adaptado de Soukos & Godson, 2011.

No entanto, esse mecanismo ainda não está totalmente compreendido. Existem duas hipóteses: a) transferência direta de elétrons entre o corante e biomoléculas; b) transferência de energia, pela excitação do corante, resultando na formação de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Bhatti *et al.*, 1997).

Após irradiação com uma luz de comprimento de onda específico, ressonante ao corante, o agente fotossensibilizador absorve os fótons da fonte de luz, e suas moléculas sofrem uma transição, saem do seu estado fundamental e passam a um estado singlete excitado de energia. Em seguida, estas moléculas podem retornar ao seu estado fundamental, com emissão de fluorescência, ou passar por um sistema intermediário e chegar a um estado tripleto excitado de energia. Neste estado tripleto, as moléculas mais estáveis vão interagir, na água, com o oxigênio e ao retornar a seu estado fundamental, transferem energia, produzindo espécies altamente reativas, como é o caso do  $^1\text{O}_2$ , radicais livres e ânions superóxidos. No estado tripleto, existem dois mecanismos (tipo I e II) de interação com as biomoléculas (Wainwright, 1998; Meisel & Kocher, 2005; Konopka & Golinski 2007; Takasaki *et al.*, 2009) (Figura 2).

O mecanismo do tipo I envolve a transferência de elétrons ou captação de átomos de hidrogênio entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e

biomoléculas, gerando radicais livres e íons-radicais, que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultado em produtos altamente reativos (Konopka & Golinski, 2007; Takasaki *et al.*, 2009). Mais especificamente, este mecanismo ocorre quando o composto fotoativo no estado singleto ( $^1\text{FS}^*$ ) ou tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ) pode, por reação de oxidação e redução com diferentes biomoléculas, ser fotorreduzido a ânion radical, tais como peróxidos ( $\text{ROO}^\cdot$ ), ânion superóxidos ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio, que provocam a destruição da membrana celular de macromoléculas (Borissevitch & Schaberle, 2006).

No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia. O fotossensibilizador no estado tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ), transfere energia para a molécula de oxigênio, cujo estado fundamental é tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), gerando uma espécie de oxigênio altamente reativa, conhecido com oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), que pode interagir com um grande número de substratos biológicos, induzindo danos à membrana e parede celular (Borissevitch & Takasaki *et al.*, 2006; Konopka & Goslinki, 2007).

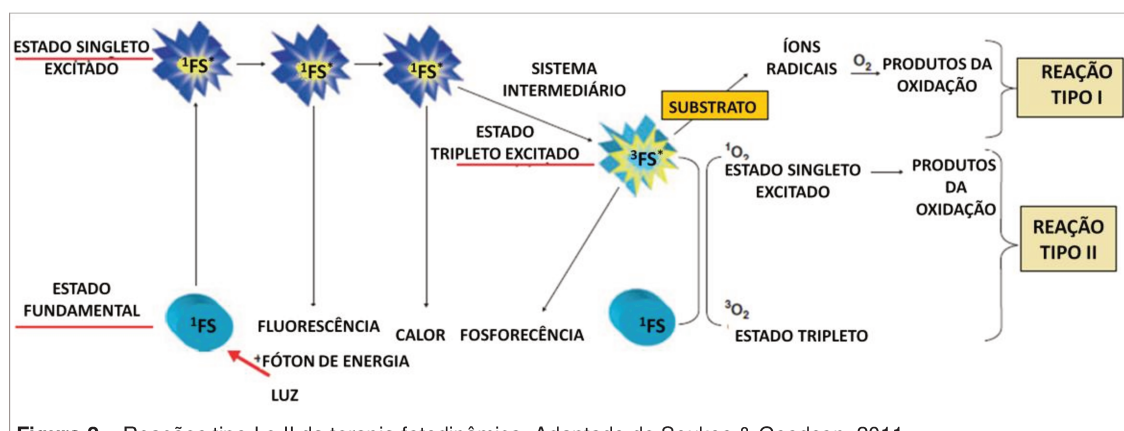


Figura 2 – Reações tipo I e II da terapia fotodinâmica. Adaptado de Soukos & Goodson, 2011

O fator que determina se vai ocorrer reações do tipo I ou tipo II, é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do sensibilizador. Atualmente, nos sistemas utilizados a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de mais ou menos 10%, enquanto, a do tipo II é de até 90%. Estes valores podem variar, dependendo das características do

fotossensibilizador e da natureza do alvo de sua ação (Borissevitch & Schaberle, 2006).

O oxigênio singlete é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação celular. Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempo de vida extremamente baixo ( $<0,04\mu\text{s}$ ). Em função disso, seu raio de ação é muito reduzido ( $<0,02\mu\text{s}$ ) (Redmond & Kochevar, 2006). Apesar disso, o  $^1\text{O}_2$  exerce fortes efeitos citotóxicos aos componentes moleculares da célula, tais como: proteínas, fosfolípidos da membrana celular, DNA e lisossomos, tendo como resultado a morte celular. Por causa da difusão limitada de  $^1\text{O}_2$ , como resultado de sua meia-vida curta, os locais das lesões celulares da TFD estão relacionados com o local de aplicação do fotossensibilizador. Assim, a reação leva a uma reposta localizada, o que a torna ideal para aplicação em infecções localizadas, sem ter que afetar outras células ou órgãos. E, além disso, a reação para imediatamente, após a luz ser desligada (Meisel & Kocher, 2005; Takasaki *et al.*, 2009).

### **2.3.3. Fontes de luz**

Com relação às fontes de luz utilizadas na TFD, as primeiras a serem utilizadas foram lâmpadas convencionais com luz não coerente e policromática, com um forte componente térmico associado. Com o advento dos lasers, esse passou a substituir as demais fontes de luz devido às suas propriedades: concentração elevada de energia, pouca dispersão de energia à medida que a luz se propaga, coerência e monocromaticidade, possibilidade de iluminação de um meio composto por materiais diversos e somente interação com um determinado componente (seletividade) (Acroyd *et al.*, 2001). Atualmente, as fontes mais utilizadas com seus respectivos comprimentos de onda são: laser de He-Ne (632,8nm); laser de Diodo AsGaAl (620-690nm); laser de Diodo InGaA IP (635-685nm) e laser de Argônio (488-514nm) (Ribeiro *et al.*, 2005; Konopka & Goslinski, 2007; Takasaki *et al.*, 2009).

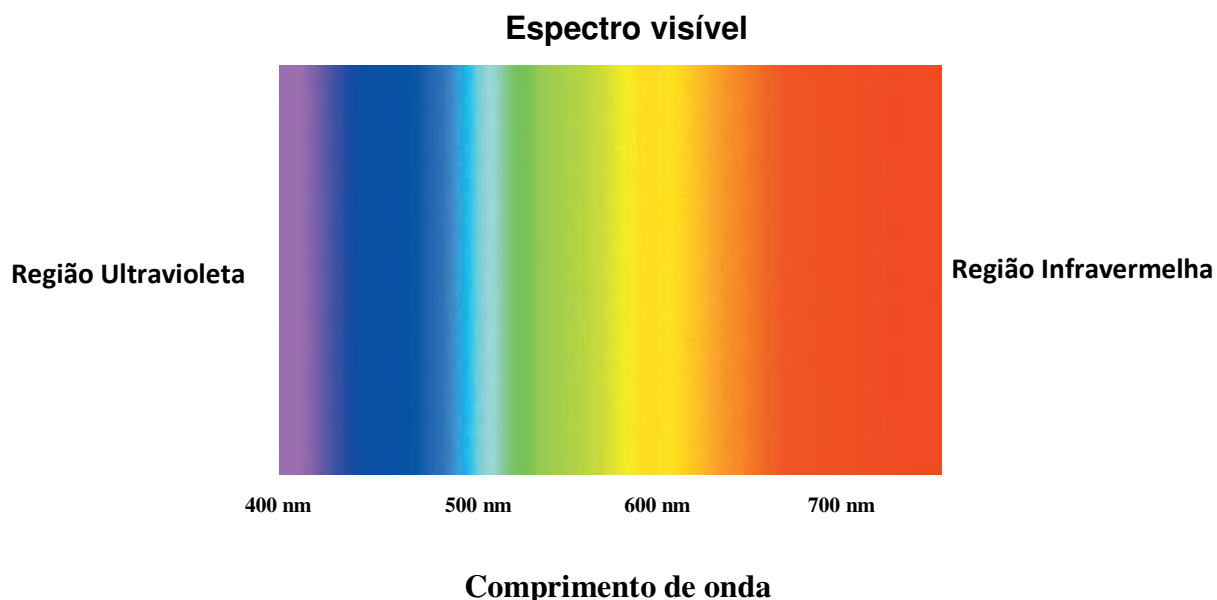
Uma outra alternativa de fonte de luz mais recentemente utilizadas são os LEDs (*Light Emiting Diodes* – diodos emissores de luz). Os LEDs, são estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção, por diferença de cargas, ocorre a emissão de luz, com aumento de temperatura menor quando comparado ao laser. Estes dispositivos emitem luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes, diferindo-se dos lasers, que produzem emissão estimulada de radiação (Karu, 2003).

O uso do LED como fonte de luz na TFD tem sido discutido em alguns estudos (Dobson & Wilson, 1992; Giusti *et al*, 2008) e quando comparados aos sistemas de lasers disponíveis, apresentam vantagens como menor custo, apresentam um baixo componente térmico, luz monocromática e ainda possuem um tempo de vida maior. Por esses motivos, essa técnica tornou-se mais atraente, permitindo sua maior implementação (Ribeiro *et al.*, 2005).

Para que a luz exerça algum efeito sobre as células bacterianas, primeiramente ela deve ser absorvida por um ou mais constituintes da bactéria. Luzes com comprimento de onda menores que 300nm (espectro ultravioleta da luz) são absorvidas por proteínas e ácidos nucléicos, o que pode resultar em morte principalmente devido a alterações na estrutura do DNA (Figura 3). Desse modo, devido ao seu potencial mutagênico, comprimentos de onda situados no espectro ultravioleta da luz são impróprios para o tratamento de doenças infecciosas em humanos (Wilson, 1993). Os LEDs, emitem luz numa estreita faixa de comprimento de onda (Mills *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2003; Pires, 2005).

Os principais parâmetros da luz envolvidos na terapia fotodinâmica são: energia (quantidade de luz que está sendo depositada no tecido); potência (energia capaz de provocar maior ou menor reação fotodinâmica); irradiância e densidade de potência (é através do controle de irradiância que o operador pode gerar fotoativação); potência, dosimetria e densidade de energia (taxa de energia que está sendo aplicada no tecido) e comprimento de onda (define a profundidade de penetração no tecido) (Meisel & Kocher, 2005).





**Figura 3.** Visualização do espectro eletromagnético. Adaptado de Soukos & Godson, 2011.

#### **2.3.4. Fotossensibilizador**

A maioria das bactérias orais não absorve a luz visível. A utilização de um agente de absorção óptica não-tóxico (também chamado de cromóforo ou fotossensibilizador) que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz (laser/LED) no momento da irradiação é essencial para que haja a ação antimicrobiana sobre as células bacterianas (Wilson *et al.*, 1992; Wilson, 1993). O fotossensibilizador funciona como um agente de absorção óptica, sendo essencial usar um tipo adequado ao comprimento de onda da luz a ser utilizada (Zanin & Gonçalves, 2003).

A fotossensibilidade da bactéria parece estar relacionada com o tipo da droga. Em geral, fotossensibilizadores neutros ou aniônicos são efetivos para eliminar bactérias gram-positivas, enquanto que nas bactérias gram-negativas somente se acumulam na membrana externa. A porosidade relativa da membrana de espécies gram-positivas permite ao fotossensibilizador se difundir para sítios sensíveis, já a membrana externa das gram-negativas atuam como uma barreira física entre a célula e o ambiente. Para essas, as drogas devem ser catiônicas, ou

ser conjugadas com anticorpos monoclonais, que conseguem atravessar a membrana (Wainwright, 1998; Rovaldi *et al.*, 2000; Hamblin & Hasan, 2004; Kömerik & MacRobert, 2006).

Outros fatores de relevância, que na maioria das vezes são cruciais para o sucesso da terapia fotodinâmica, é a interação do corante com o alvo e a concentração do corante. Este varia de um corante para outro, de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade, enquanto aquele varia de acordo com a interação desejada. Nas aplicações tópicas da TFD antimicrobiana, espera-se que o corante una-se aos microrganismos ou chegue a ultrapassar a membrana citoplasmática, localizando-se no citoplasma da célula. Para que isto ocorra é necessário um tempo de pré-irradiação, ou seja, um tempo entre a aplicação do fotossensibilizador no alvo e sua ativação pela fonte de luz. Os tempos utilizados na TFD antimicrobiana variam de 1 a 10 minutos (Ribeiro *et al.*, 2005).

As propriedades físico-químicas dos fotossensibilizadores e dos sistemas biológicos em que irão atuar são extremamente importantes para a eficiência do processo de fotossensibilização. A habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos são importantes para ser considerado ideal: não apresentar características tóxicas para as células do hospedeiro; apresentar toxicidade local apenas após a ativação pela luz; permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua interação com as moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar a morte bacteriana; ter alta solubilidade em água, alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade) (Meisel & Kocher, 2005; Konopka & Goslinski, 2007).

O comprimento de onda da luz necessária à foto-excitação do composto é outra característica importante. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido. Portanto, as drogas desenvolvidas para uso em TFD devem ser corantes que absorvam na região

próxima ao infra-vermelho (Levy, 1995). Acima de 800nm ocorre absorção da radiação pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite superior (Simplicio *et al.*, 2001) (Figura 2).

Diversos fotossensibilizadores têm sido utilizados para erradicação de microrganismos, dentre eles: o azul de metileno, o azul de toluidina O, conjugados de clorinas, porfirinas (hematoporfirina, ALA, Photofrin<sup>®</sup>, Photogen<sup>®</sup>), eritrosina, fitoterápicos e ftalocianinas (Wainwright, 1998).

### 2.3.5. TFD em Odontologia

O potencial da terapia fotodinâmica em bactérias orais começou a ser investigado na década de 90 quando Dobson & Wilson (1992) analisaram a redução bacteriana de *S. sanguinis*, *Aa*, *Fn* e *Pg*. Foram utilizadas bactérias do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. Amostras da placa subgengival foram expostas ao laser de He-Ne (P=7,3mW) na presença e na ausência de diferentes corantes. Os autores concluíram que os corantes azul de metileno e azul de toluidina foram eficazes na redução das quatro espécies bacterianas. No entanto, os corantes, ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina e éster de hematoporfirina, sensibilizaram apenas alguns dos microorganismos. Os autores sugeriram que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva em eliminar bactérias.

Ainda em 1992, Wilson e col., investigando vinte e sete outros compostos associados a um laser de He-Ne de 7,5mW frente a diferentes microorganismos, observaram que apenas os corantes azul de metileno, azul de toluidina e o cloreto azul B, na concentração de 0,005%, foram efetivos contra as bactérias *S. sanguis*, *Aa*, *Fn* e *Pg*, quando associados a uma exposição de 30 segundos.

Oliveira *et al.* (2007), utilizaram os corantes eritrosina e rosa bengala associado ao LED azul ( $\lambda = 440-460$  nm) para avaliar a ação da TFD sobre culturas planctônicas de *Streptococcus mutans*. Conclui-se que a fotossensibilização *in vitro* do rosa bengala e da eritrosina por LED apresentou atividade antimicrobiana sobre todas as cepas de *S. mutans* estudadas.

Prates *et al.* (2007), avaliaram a habilidade do verde malaquita a 0,01 % associado à irradiação *laser* em baixa intensidade (*laser* vermelho – 660 nm) em matar o *Aa* em suspensão, bem como investigar por espectroscopia de absorção óptica, a degradação do verde de malaquita após a irradiação, e as alterações que ocorrem no sistema irradiado antes e após a terapia fotodinâmica. De acordo com os autores notou-se que o *laser* combinado com o corante nas doses de 5,4 e 9 J/cm<sup>2</sup>, levou em ambas a redução significativa desse periodontopatógeno, e também o corante é degradado após a irradiação, com formação de novos produtos na suspensão.

Lima *et al.*, em uma pesquisa *in situ*, no ano de 2009, aplicando terapia fotodinâmica antimicrobiana avaliaram o efeito da TFD em cárie em dentina, ao longo de 14 dias, em 20 voluntários que usavam dispositivos intrabuciais, contendo pequenos quadrados de dentina humana. Os autores encontraram redução bacteriana significativa com a utilização de azul de toluidina e aplicação de luz (LED) em ambas as densidades de energia, 47J/cm<sup>2</sup> e 90J/cm<sup>2</sup>. Concluíram que a TFD pode ser utilizada de maneira eficaz para eliminação de bactérias na dentina cariada antes da restauração dentária.

Baptista *et al.* (2010), desenvolveram lesões de cárie dentária em modelo animal para avaliar a redução microbiana através da terapia fotodinâmica associando como fotoabsorvedor o azul de metileno e LED de emissão vermelha (entre 610 e 670 nm). Os resultados obtidos sugerem que a terapia fotodinâmica antibacteriana foi efetiva na redução de microaerófilos totais nos parâmetros testados.

Existem algumas vantagens da desinfecção bucal com a utilização de TFD em relação ao uso de agentes antimicrobianos convencionais (Couvarlin, 1996; Bidault *et al.*, 2007; Chondros *et al.*, 2009). A TFD não está ligada à mediação de radicais químicos com ação a um único ponto de ataque, ao contrário, o fotossensibilizador age produzindo oxigênio singleto, que não possui especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares; isso torna o desenvolvimento de cepas resistentes improvável (Fontana *et al.*,

2009). Além disso, o fotossensibilizador não precisa ser mantido em altas concentrações na área infectada por longos períodos de tempo como os antimicrobianos convencionais (Wilson *et al.*, 1995).

Wilson, em 2004, em estudo sobre o potencial letal bacteriano na aplicação da TFD em infecções bucais, como cáries, doenças periodontais e infecções do conduto dentário, concluiu que as vantagens dessa terapia são: a bactéria pode ser erradicada em um curto espaço de tempo (segundos ou minutos), o desenvolvimento de resistência nas bactérias-alvo é improvável, e danos aos tecidos adjacentes e perturbação da microflora normal podem ser evitados.

Em 2007, um estudo de Konopka e Goslinski enfocou a TFD, realizando extensa revisão de literatura sobre o tema; avaliando a reação fotodinâmica, a utilização de fotossensibilizador, fontes de luz, estudos *in situ* e *in vivo*, mecanismo de inativação dos microrganismos, efeitos da terapia em biofilmes e direções futuras. Encontraram que a TFD oferece vantagens para a inativação de microrganismos, tais como o baixo potencial mutagênico das células expostas, o amplo espectro de ação e a capacidade de promover citotoxicidade sobre grande variedade de bactérias, fungos e protozoários.

Embora ainda não exista um consenso na utilização dos agentes fotoativos para TFD na descontaminação bucal, novas gerações de corantes têm sido estudadas, no intuito de buscar novos compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes, contribuindo para uma maior atividade, menor custo e maior popularização da TFD (Ushoa *et al.*, 2007). Uma das opções bastante estudadas é a curcumina, que tem sido descrita em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório (Abe *et al.*, 1999; Ramsewak *et al.*, 2000; Literat *et al.*, 2001).

### **2.3.6. Curcumina**

A curcumina é um pigmento natural, de coloração amarela, extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., conhecida também como açafrão-da-índia (Haukvik *et al.*, 2009). Esta planta é originária do sudeste da Ásia, e vem sendo

tradicionalmente utilizada como condimento alimentar e também como medicamento natural na medicina tradicional indiana (Haukvik *et al.*, 2009). Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem confirmado o potencial terapêutico da curcumina, como seu efeito anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antitumoral (Samaranayake & MacFarlane, 1990; Richards *et al.*, 1999; Haukvik *et al.*, 2009).

A curcumina é um pigmento que compõe um dos princípios ativos da *Curcuma longa*. O corante comercial encontrado no mercado contém três cucurminóides que lhe conferem a cor amarelo alaranjada típica e são os principais responsáveis pelas atividades biológicas da *Curcuma longa*: a curcumina (77%), a demetoxicurcumina (17%) e a bisdemetoxicurcumina (3%) (Takahashi, 1987; Rusig & Martins, 1992; Péret-Almeida *et al.*, 2008).

Estudos também têm sugerido que alguns dos efeitos terapêuticos da curcumina poderiam ser acentuados com a sua exposição a uma fonte de luz (Wilson & Mia, 1994; Cavalcante *et al.*, 2009). A ação fotodinâmica dos derivados de curcumina tem sido investigada mais frequentemente com a finalidade de tratamento de tumores, bem como sua farmacocinética, toxicidade e eficácia da substância (Hauvik *et al.*, 2009). Adicionalmente, alguns estudos mostraram que a fotoativação microbiana pode ser obtida (Dahl *et al.*, 1994; Chignell *et al.*, 1994).

Haukvik *et al.* (2009), estudando a ação antimicrobiana da curcumina, citam que ela é um potencial fotossensibilizador em TFD para infecções localizadas superficialmente. Ressaltam que é um desafio fazer uma formulação de curcumina ideal em que ela tenha aceitável solubilidade e estabilidade em pH fisiológico e, concomitantemente, uma atividade fototóxica para bactérias. Neste estudo, os efeitos fototóxicos da curcumina contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) e gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius*) foram investigados em determinadas preparações aquosas (2,5 e 25µM). Os autores mostraram que a curcumina, usada como fotossensibilizador em TFD, possui efeito antimicrobiano.

A alta capacidade de absorção de luz em comprimentos de onda próximos ao azul (300-500nm – máximo de aproximadamente 430nm) faz com que a curcumina seja um potencial fotossensibilizador para o tratamento de lesões superficiais, uma vez que estas não requerem profunda penetração da luz nos tecidos para seu tratamento (Araújo *et al.*, 2012a).

Com relação à estabilidade da curcumina, Tonnensen *et al.* (1985), verificaram que a curcumina é instável em pH maior que 8,0. Resultados semelhantes foram observados por Rusig & Martins (1992), os quais constataram a faixa de pH entre 4 e 8 como a que proporcionou maior estabilidade à molécula curcumina e que em pH superior a 8, a velocidade de degradação foi significativamente maior. No mesmo trabalho, os autores estudaram também o efeito da temperatura e observaram que até 100°C não houve perda significativa de curcumina. Entretanto, a 125°C houve degradação de 15,25 % do pigmento em relação aos teores iniciais.

Dahl *et al.*, (1989) em um estudo sobre fototoxicidade da curcumina, mostraram que a curcumina provou ser atóxica em uma série de culturas de células e em todos os estudos animais. Relataram também que a curcumina mostrou ter efeito bactericida em concentrações muito elevadas e, quando iluminada, exerceu potentes efeitos fototóxicos em quantidades micromolares. As bactérias gram-negativas apresentaram maior resistência à fototoxicidade da curcumina em relação às bactérias gram-positivas.

Dovigo *et al.*, (2011) avaliaram a viabilidade de utilização da curcumina como agente fotossensibilizador na TFD para inativação de uma cepa referência de *Candida albicans* e seu efeito sobre células de macrófagos. Suspensões planctônicas de *C. albicans* foram expostas a nove concentrações de curcumina (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 2 20µM) e oito doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4J/cm<sup>2</sup>). O efeito de diferentes tempos de pré-irradiação, a possível captação de curcumina pelas células fúngicas e participação do oxigênio singlete na fotoinativação também foram avaliados. Adicionalmente, a TFD mediada pela curcumina foi avaliada em biofilmes formados pela cepa de

referência de *C. albicans* e sobre culturas celulares de macrófagos. Os resultados mostraram que as suspensões planctônicas de *C. albicans* foram completamente inativadas com a utilização de 20 $\mu$ M de curcumina e 5,28J/cm<sup>2</sup>. Além disso, foi observada redução significativa na viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans*. O efeito fotodinâmico foi acentuado pela presença da curcumina durante a iluminação e pela utilização de 20 minutos de pré-irradiação. Apesar da toxicidade observada nos macrófagos, a TFD foi mais efetiva para inativar as células fúngicas do que as células imunológicas.

Ribeiro *et al.*, (2013), investigaram o efeito da TFD da curcumina em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) comparado ao *S. aureus* suscetíveis à metilicina (MSSA) e fibroblastos L929. Suspensões de MSSA and MRSA foram tratados com diferentes concentrações de curcumina (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 $\mu$ M) e expostos à luz LED. Diluições seriadas foram obtidas de cada amostra e as contagens das colônias foram quantificadas. Para os fibroblastos, a viabilidade das células subsequente foi avaliada usando ensaios de MTT (metil tiazol tetrazólio) e mudanças morfológicas foram avaliadas por análises de microscopia eletrônica de varredura. As concentrações de curcumina variando de 5 a 20 $\mu$ M em combinação com o LED resultou em morte de MSSA. Entretanto, apenas a concentração de 20 $\mu$ M da curcumina com o LED resultou em morte do MRSA. Essa combinação também promoveu uma redução em 80% no metabolismo e na mudança da morfologia dos fibroblastos, indicando que as membranas celulares foram os principais alvos dessa fototerapia. A combinação de curcumina com LED causou a morte de ambas as cepas de *S. aureus* e pode representar uma alternativa de tratamento para erradicar MRSA.

Araújo *et al.*, (2012b) avaliaram a suscetibilidade de culturas planctônicas de *S. mutans* e *L. acidophilus* à terapia fotodinâmica após sensibilização com curcumina e exposição à luz LED azul, com comprimento de onda de 450nm. As suspensões bacterianas isoladas e combinadas foram preparadas e então avaliadas. Quatro diferentes grupos foram analisados: sem nenhuma terapia (grupo controle), aplicação apenas da curcumina (grupo da droga), aplicação



apenas da luz (grupo da luz) e o grupo que recebeu tanto a luz quanto a droga (grupo da TFD). Duas diferentes concentrações de curcumina foram testadas (0,75 and 1,5g/L) associado com uma LED com 5,7 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia. Diminuições significativas na viabilidade de *S. mutans* foram observadas apenas nas suspensões bacterianas que foram expostas ao grupo da TFD. Reduções na viabilidade de até 99,99% foram observadas quando foi usado 1,5g/L do fotossensibilizador. A susceptibilidade de *L. acidophilus* foi consideravelmente menor (21% e 37.6%) para ambas as concentrações de curcumina. Os autores concluíram que a TFD foi efetiva na redução de *S. mutans* e *L. acidophilus* em culturas planctônicas.

Araújo *et al.*, (2012a), avaliaram a susceptibilidade geral de patógenos da saliva na TFD após sensibilização com curcumina (5 min) e exposição à luz azul de 450nm (5 min). As amostras de saliva foram coletadas de 13 pacientes. Os seguintes grupos foram analisados: 1) grupo controle – sem luz nem curcumina; 2) grupo curcumina – tratado apenas com a curcumina e 3) grupo TFD – tratado com luz e curcumina. As amostras de saliva foram coletadas para contagem bacteriana no *baseline* e após a fase experimental. Após contagem das unidades formadoras de colônias observou-se que houve uma diferença considerável entre os dois grupos experimentais com relação à efetividade da redução bacteriana. No grupo só curcumina (9%), o declínio bacteriano foi consideravelmente menor do que no grupo TFD, que teve 68% de declínio bacteriano. Uma redução significativa da população bacteriana foi vista apenas no grupo da TFD. Os autores concluíram então que a TFD foi efetiva na redução de microrganismos salivares.

Andrade *et al.*, (2013), avaliaram os efeitos do tempo de pré-irradiação da curcumina mediada pela TFD em culturas planctônicas e biofilme de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*. Suspensões e biofilmes das espécies de *Candida* foram mantidos em contato com diferentes concentrações de curcumina (5, 10, 20, 30 e 40µM) por intervalos de tempo de 1, 5, 10 e 20 minutos antes da ativação do LED por 4 minutos. Adicionalmente, amostras foram tratadas apenas com curcumina sem iluminação ou apenas com luz sem curcumina.

Amostras controles não receberam nem curcumina nem luz. Microscopia a laser confocal foi feita para fornecer um melhor entendimento da penetração da curcumina através do biofilme. Os diferentes tempos de pré-irradiação não mostraram diferenças estatísticas nas suspensões de células de *Candida spp.* Houve uma completa inativação das três espécies de *Candida* com a associação de 20µM de curcumina após 5, 10 e 20 minutos de tempo de pré-irradiação. As culturas de biofilmes mostraram redução significativa na viabilidade celular com a associação de 40µM de curcumina e 20 minutos de pré-irradiação. Além disso, as observações da microscopia a laser confocal mostraram diferentes intensidades de emissões de fluorescência após 5 e 20 minutos de incubação. Os autores concluíram que a fotoativação de culturas planctônicas não é dependente do tempo de pré-irradiação. No entanto, a dependência do tempo de pré-irradiação foi observada nas culturas de biofilme e esta difere entre as espécies avaliadas. Também, as observações da microscopia confocal confirmaram a necessidade de um maior intervalo de tempo para a curcumina penetrar as camadas mais internas do biofilme.

### **2.3.7. TFD na Periodontia**

O sucesso da TFD na eliminação de microrganismos o indica como uma terapia coadjuvante para infecções microbianas localizadas, como a doença periodontal (Jori, 2006; Komerik & MacRobert, 2006). Nos últimos anos foi publicado um grande número de estudos, que descrevem a morte de bactérias periodontopatogênicas através de métodos fotodinâmicos (Sarkar & Wilson, 1993; Komerik *et al.*, 2000; Chan & Lai, 2003; Komerik *et al.*, 2003; Sigush *et al.*, 2005; Sousa, 2007; De Almeida *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008; Polansky *et al.*, 2009).

Wilson *et al.*, (1993) utilizaram o laser de He-Ne, com comprimento de onda 632,8nm e 7,3mW de potência, associado aos fotossensibilizadores: azul de toluidina, azul de metileno, ftalocianina e hematoporfirinas. Testaram as bactérias *S. sanguinis*, *Aa*, *Fn* e *Pg*. Foram utilizadas bactérias do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. Amostras da placa subgengival foram

expostas à luz, na presença e na ausência do corante azul de toluidina na concentração de 50µg/ml. Os autores concluíram que a combinação laser e corante alcançou uma significativa redução bacteriana, sendo que a média de redução foi de 91,1% nas bactérias aeróbias, 96,9% nas anaeróbias, 100% nas pigmentadas anaeróbias e 94,4% para o *Streptococcus*. Entretanto, a redução bacteriana não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do laser. Isso sugere que o laser em baixa intensidade associado ao corante apropriado pode ser efetivo como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico em inflamações periodontais, pois três dos principais responsáveis pela etiologia da doença periodontal podem ser mortos por essa modalidade de tratamento.

Com o objetivo de conhecer o efeito do azul de toluidina na TFD, Qin *et al.*, (2008a) coletaram amostras de placa supragengival de 20 pacientes para análise das bactérias *Leptotrichia buccalis* (Lb), *Vignal's bacillus* (Vn), *Veillonella* (V), *Streptococcus* (S) e *Aa*. A morte de 47% a 99% das bactérias foi obtida pela combinação do azul de toluidina (1mg/ml) seguida da exposição ao laser diodo (635nm; 212mW/cm<sup>2</sup>; 12J/cm<sup>2</sup>; 57 segundos). Os autores sugeriram que a TFD é eficiente para destruir bactérias supragengivais, mas essa eliminação varia de um paciente para o outro.

Em um estudo *in vitro*, utilizando-se a terapia fotodinâmica para inativação de bactérias periodontopatogênicas, Sousa (2007) avaliou e comparou a sensibilização letal das bactérias periodontopatogênicas (*Fn*, *Aa* e *Pi*), através da utilização de lasers (660 nm) e LED (emitindo entre 620 e 630 nm), utilizando como fotossensibilizador azul de toluidina O a 0,01%. Os resultados demonstraram uma redução percentual de 99,8% para o *Aa* e *Fn* e um resultado não satisfatório de 49,5% para a *Pi*. Desta forma demonstrou-se que o corante azul de toluidina O a 0,01% associado aos lasers e ao LED apresenta um excelente potencial para a utilização em terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação aos dois primeiros microrganismos. Foi observado também que não houve diferença significativa do LED em relação ao laser de baixa intensidade.

Mostrando assim que os LEDs podem ser uma nova e boa opção para a terapia fotodinâmica antimicrobiana.

De Almeida *et al.*, (2007) avaliaram através de microscopia óptica e análise radiográfica, o efeito da terapia fotodinâmica na evolução da doença periodontal induzida em ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos (I – controle, II – tratamento tópico com azul de metileno 100µg/ml, III – tratamento apenas com laser e IV – tratamento com TFD) e foram colocadas ligaduras ao redor dos primeiros molares. O grupo da TFD foi tratado com azul de metileno a 100µg/ml e irradiado com laser de baixa intensidade com dose de 4,5J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados 5, 15 e 30 dias após o tratamento e avaliados histologicamente e radiograficamente. O grupo da TFD apresentou menor perda óssea comparada ao grupo controle nos 5 e 15 dias. Não houve diferença estatística nos 30 dias. Após 15 dias, os resultados histológicos mostraram diferença estatística na extensão da reação inflamatória no tecido gengival. Concluiu-se, portanto, que a TFD pode reduzir a destruição óssea periodontal transitoriamente.

Qin *et al.*, (2008b) compararam a eficácia da TFD com a RAR em periodontite induzida em ratos. Após 6 semanas de indução da periodontite nos molares superiores, os sítios foram tratados com: aplicação de 1mg/ml de azul de toluidina O e irradiado com laser no vermelho do espectro eletromagnético com 12J/cm<sup>2</sup>, ou com RAR. A eficácia da terapia foi avaliada pela redução bacteriana, alterações histológicas e alteração dos tecidos periodontais. Como resultado, observaram redução significativa da flora bacteriana em ambas as terapias. Os sinais de inflamação, índice de placa e índice gengival, sangramento à sondagem e infiltrado inflamatório, foram reduzidos sem qualquer prejuízo aos tecidos do hospedeiro. A TFD e a terapia convencional mostraram resultados terapêuticos semelhantes.

Komerik *et al.*, (2000) relataram a redução da atividade de fatores de virulência como lipopolissacarídeos (LPS) e proteases após a TFD associada com o fotossensibilizador azul de toluidina O. Zanin & Brugnera Jr (2007) também divulgaram que a TFD parece ter efeito sobre alguns fatores de virulência

microbianos como os LPS presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas.

No intuito de avaliar a ação da TFD na redução da perda óssea alveolar decorrente de periodontite Komerik *et al.*, (2003) inocularam ratos com *Pg* e os expuseram ao laser diodo (630nm; 0,1W; 6;12;24 e 48J; 1;2;4 e 8 minutos) na presença de azul de toluidina. A perda óssea encontrada nos animais tratados com TFD foi significativamente menor quando comparada ao grupo controle.

Nos últimos anos alguns estudos clínicos têm introduzido a terapia fotodinâmica na prática da periodontia como um coadjuvante no tratamento das doenças periodontais (Wainwright, 2002; Meisel & Kocher, 2005; Sousa, 2007; Tavares *et al.*, 2010).

No intuito de avaliar a ação antimicrobiana da TFD quando associado com a RAR, Andersen *et al.*, (2007) verificaram que a terapia combinada (RAR + TFD (laser diodo; 670nm; 150mW; 60 segundos; 10-20J/cm<sup>2</sup> com azul de metileno 0,005%) melhorou significativamente os parâmetros clínicos investigados; PS, SS e NIC, 12 semanas após o tratamento quando comparada com a RAR sozinha. Os resultados revelaram um ganho no NIC de 0,86 mm; redução na PS de 1,11 mm e uma melhora no SS de 59% no grupo que foi tratado com RAR+TFD. O grupo da RAR obteve um ganho no NIC de 0,36 mm; redução na PS de 0,74 mm e melhora no SS de 56%. No grupo da TFD o ganho do NIC foi de 0,14 mm; 0,67 mm de redução na PS e melhora de 73% no SS.

Campos *et al.* (2013), avaliaram em um estudo clínico, controlado, randomizado de boca dividida, o efeito de uma única aplicação da TFD como adjunto à RAR em bolsas residuais de dentes unirradiculares. Os indivíduos deveriam apresentar no mínimo duas bolsas residuais com PS  $\geq$  5mm e sangramento à sondagem. Os sítios selecionados foram atribuídos para receber (1) TFD + RAR e (2) RAR. Nos sítios tratados com TFD como adjunto à RAR, o laser utilizado foi um laser diodo com comprimento de onda de 660nm, com potência de 60mW e densidade de energia de 129J/cm<sup>2</sup>, junto com o azul de metileno como fotossensibilizador (10mg/ml). Os parâmetros clínicos foram

avaliados no *baseline* e 3 meses após as terapias, e mostraram melhoras significantes após ambas terapias. Entretanto, uma maior redução na profundidade de sondagem das bolsas e ganho no NIC foram observados no grupo que recebeu TFD + RAR nos 3 meses de avaliação. Além disso, os sítios tratados pela abordagem combinada, apresentaram uma redução significativa no número de sítios com PS < 5mm sem SS após os 3 meses quando comparados aos sítios tratados apenas com a RAR. A TFD como um adjunto ao debridamento mecânico demonstrou benefícios clínicos adicionais em bolsas residuais em dentes unirradiculares e pode ser uma estratégia terapêutica alternativa na terapia periodontal de suporte.

Resultados interessantes foram alcançados por Christodoulides *et al.*, (2008) ao realizarem um estudo em pacientes periodontais. Nessa pesquisa o grupo controle foi submetido à RAR, e o grupo teste, exposto à TFD (laser diodo 670nm; 75mW; 1 minuto e cloreto de fenotiazina) associada à RAR. Verificou-se que uma única aplicação da TFD associada à RAR fracassou em melhorar adicionalmente a PS, o NIC e a quantidade de periodontopatógenos, mas resultou em uma alta redução do índice gengival no grupo teste comparado com o grupo controle nos 3 e 6 meses após a terapia.

Uma revisão sistemática foi realizada por Schwarz *et al.*, (2008) para avaliarem o efeito da aplicação do laser na terapia periodontal não-cirúrgica. Detectaram existir evidências científicas insuficientes que suportem a aplicação dos lasers de CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, Nd:YAP e diodo. Constataram que o laser Er:YAG aplicado na terapia periodontal não-cirúrgica apresentou resultados clínicos similares ao tratamento mecânico convencional em pacientes com periodontite crônica. Em outra revisão, Karlsson *et al.*, (2008) sugeriram que o uso, como primeira opção, da RAR conjuntamente com o laser deve ser feito com cautela até o surgimento de novas pesquisas com maior valor estatístico.

Chondros *et al.*, (2009) pesquisaram clinicamente e microbiologicamente a efetividade da associação RAR+TFD nos pacientes periodontais em manutenção. Os 12 pacientes do grupo controle foram tratados com instrumentação

subgengival e os 12 pacientes do grupo teste após a instrumentação receberam uma única aplicação de TFD (laser diodo 670nm; 75mW/cm<sup>2</sup>; 1 minuto e cloreto de fenotiazina 10mg/ml). As variáveis clínicas IP, PS, NIC, recessão gengival (RG), SS e amostras de biofilme bacteriano subgengival foram coletadas no *baseline*, 3 e 6 meses após as terapias. Mudanças estatisticamente significantes na PS e no NIC foram encontradas nos dois grupos. No grupo teste as diferenças na PS foram 0,6 mm aos 3 meses e 0,8 mm aos 6 meses; os valores correspondentes ao NIC foram 0,5 mm aos 3 meses e 0,7 mm aos 6 meses. No grupo controle essas mudanças aos 3 e 6 meses foram respectivamente de 0,6 mm e 0,9mm na PS; 0,4 mm e 0,5mm no NIC. Os autores afirmaram que apesar da TFD ter fracassado em melhorar adicionalmente a redução da PS e o ganho no NIC, houve uma diminuição significativa no SS no grupo teste comparado com o controle. A análise microbiológica revelou um declínio significativo no grupo teste de *Fn* e *Eubacterium nodatum* aos 3 meses e de *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga species* aos 6 meses.

Muitos autores têm relatado a ação antimicrobiana da TFD sobre bactérias crescidas em caldo de cultura (Dobson & Wilson, 1992; Wood *et al.*, 1999; Willians *et al.*, 2004; Zanin *et al.*, 2005, 2006), mas poucos são os estudos que avaliam a ação antimicrobiana dessa terapia na presença de biofilme (Wood *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2002). Os estudos têm demonstrado que a presença de microrganismos bucais em biofilme dificulta a eficácia da técnica, pois isto diminui a absorção do fotossensibilizador e luz pelos microrganismos dentro da estrutura formada pelo biofilme (De Beer *et al.*, 1994; Soukos *et al.*, 2003; Spratt *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2009).

O'Neill *et al.*, (2002) avaliaram a ação da TFD em microrganismos planctônicos (saliva) e em biofilme. Tendo como pressuposto que os microrganismos em biofilme apresentavam refração à terapia fotodinâmica, os autores observaram neste estudo que as bactérias bucais foram sensíveis a fotossensibilização mesmo em biofilme. Os biofilmes foram expostos ao azul de toluidina e luz de Laser He-Ne. Concluíram assim, que um número significativo de

microrganismos foram inativados através da TFD aplicada, podendo ser útil no tratamento de doenças odontológicas relacionadas com o biofilme dental.

Soukos *et al.*, (2003) submeteram à TFD amostras de biofilme subgengival coletados de indivíduos com doença periodontal crônica e de biofilme formado pela espécie *Actinomyces naeslundii* (*An*) colhido na superfície de dentes bovinos. Aproximadamente 90% das espécies bacterianas do biofilme dental humano foram inativados. No biofilme de *An* o exame de microscopia revelou um aumento de 50% na profundidade de penetração do conjugado (clorine e6 + poly- L Lysine).

Oliveira *et al.*, (2007) não encontraram diferenças clínicas entre pacientes com periodontite agressiva tratados com TFD isoladamente (laser diodo 660nm; 60mW/cm<sup>2</sup>; 10 segundos e cloreto de fenotiazina a 10mg/ml) ou a RAR apenas. Os pacientes tratados com TFD não receberam a RAR. Posteriormente, ao analisarem o nível de citocinas (TNF- $\alpha$  e receptor ativo de fator nuclear ligante kappa B (RANKL)) no fluido crevicular gengival (FCG) desses pacientes, concluíram que a RAR e a TFD promoveram efeitos similares nos níveis desses marcadores. Esse resultado pode ser atribuído ao fato da TFD ter sido aplicada diretamente sobre o biofilme; o que pode ter impedido a penetração dos fotossensibilizador às camadas mais profundas do biofilme diminuindo a efetividade da TFD

Fontana *et al.* (2009), avaliaram a habilidade da TFD em reduzir o número de bactérias orais, comparando os efeitos da TFD em microrganismos planctônicos e em biofilme. Amostras de biofilmes foram obtidas de 10 indivíduos com periodontite crônica. Suspensões de microrganismos do biofilme de 5 indivíduos foram sensibilizados com azul de metileno (25 $\mu$ g/mL) por 5 minutos e expostos à luz vermelha. Biofilmes de várias espécies desenvolvidas da mesma amostra de placa foram então expostos ao azul de metileno (25 $\mu$ g/mL), sob as mesmas condições de luz utilizadas no experimento com microrganismos planctônicos. A TFD matou aproximadamente 63% das bactérias presentes na suspensão, enquanto que em biofilme a terapia teve um efeito menor na viabilidade das bactérias, matando no máximo 32% dos microrganismos. Os



autores concluíram então que as bactérias orais em biofilmes são menos afetadas pela TFD do que em microorganismos planctônicos, porém não no mesmo grau que tem sido relatado para o tratamento com antibióticos sob condições similares.

De Oliveira *et al.*, (2011), avaliaram o efeito de uma aplicação única da TFD no perfil microbiológico e no padrão de citocinas em cachorros. Os animais foram aleatoriamente tratados com: TFD (cloreto fenotiazínico como fotossensibilizador), RAR ou RAR + TFD. Amostras de placa foram coletadas no *baseline*, 1, 3 e 4 semanas e a contagem média de 40 espécies bacterianas foram determinadas usando hibridização DNA-DNA. Foram feitas biópsias gengivais e a expressão de TNF- $\alpha$ , RANKL, osteoprotegerina, MMP-1, interleucina 6, interleucina 10 e a carga bacteriana total pela análise do RNAr gene 16S foram avaliados por meio de qPCR. Os resultados mostraram que os níveis da maioria das espécies foram reduzidos 1 semana pós-terapia para todos os tratamentos, entretanto, um aumento na contagem de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* foi observado para TFD e RAR + TFD. Após 4 semanas, um novo crescimento de *P. gingivalis* e *T. denticola*, foi observado para todos os tratamentos. Foi observada também uma redução considerável das contagens de *A. actinomycetemcomitans* para a TFD. Para os padrões de citocinas, os resultados foram similares para todos os tratamentos e uma redução na expressão de citocinas e carga bacteriana foi observada em todo o estudo. Os autores concluíram que a RAR e a TFD em aplicações únicas e a RAR + TFD associadas, afetam diferentes espécies microbianas e tem efeitos similares na expressão de citocinas avaliadas durante o tratamento da periodontite induzida por ligaduras.

Sendo assim, pode-se observar que a TFD tem mostrado um resultado satisfatório no controle do biofilme oral, podendo apresentar-se como uma terapia promissora quando utilizada como adjunto à terapia periodontal não-cirúrgica.



### **3.PROPOSIÇÃO**

- Avaliar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (utilizando curcumina a 10% e luz LED azul), da clorexidina a 0,12% e do iodo povidine a 10% sobre o biofilme dentário.
- Avaliar, histométrica e histoquimicamente, a ação das três terapias supracitadas na reabsorção óssea de dentes acometidos por periodontite experimental induzida em ratos.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

O estudo incluiu 35 ratos Wistar, machos, com idade de 16 semanas e pesando de 350-400g, adquiridos do CEMIB-Unicamp (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório). Os animais foram acondicionados no biotério da FOP-UNICAMP, mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais passaram por um período de 5 dias para a aclimação ao ambiente do laboratório a uma temperatura de 22°C a 24°C. Todos os procedimentos executados estavam de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) -IBUNICAMP sob o protocolo de número 2727-1 (Anexo 1).

### **4.2. Sedação e anestesia**

Os animais foram inicialmente pesados para o cálculo da correta dosagem do anestésico geral a ser administrada. Os animais foram anestesiados por meio da administração intramuscular de ketamina (1ml/kg) (Dopalen<sup>®</sup>; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3ml/kg) (Virbaxil<sup>®</sup>; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil).

### **4.3. Colocação das ligaduras**

Após anestesia, os animais foram posicionados em aparato de Doku modificado (Doku, 1966) e os maxilares dos animais foram mantidos abertos por meio de bandas elásticas presas aos incisivos inferiores e a língua, tracionada com o auxílio de um fio de algodão espesso. Em seguida, uma lima endodôntica modificada foi introduzida entre o 1º e o 2º molares inferiores, em ambos os lados, para que fosse obtido um espaço entre os dentes para posterior inserção das

ligaduras de algodão. As ligaduras foram colocadas no *baseline*, ao redor dos primeiros molares inferiores, de forma que ficassem posicionadas o mais subgengival possível, com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme (Jonhson, 1975). Para fixação das ligaduras foram feitos três nós simples voltados para mesial.

#### 4.4. Delineamento do estudo

O desenho experimental foi de boca dividida. Foram selecionados inicialmente 30 animais para realização do experimento, entretanto dois ratos do grupo pertencente à clorexidina morreram no decorrer do estudo. Sendo assim, 28 animais compuseram a amostra do presente trabalho. Esses 28 animais foram aleatoriamente alocados em um dos seguintes grupos teste (Figura 4):

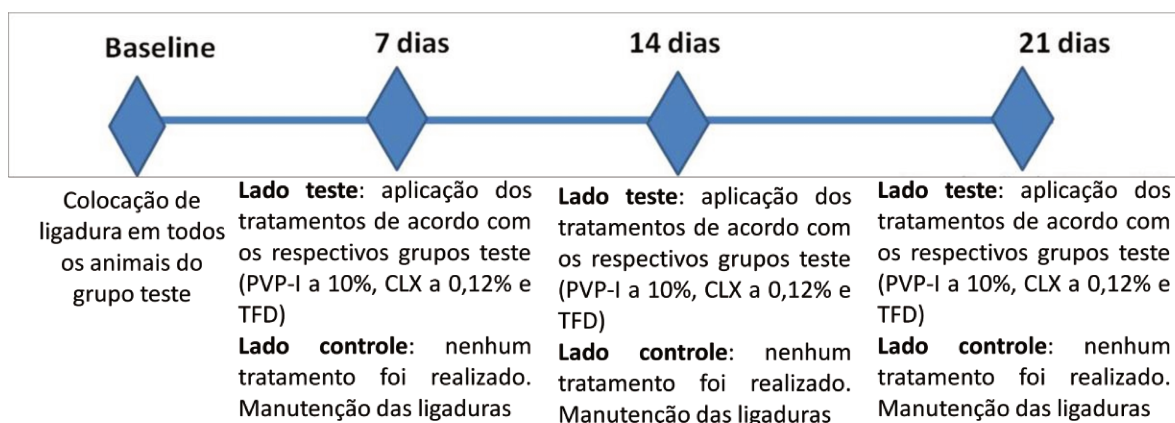


Figura 4. Delineamento do estudo

- **Iodo-povidine a 10%**

Dez animais foram selecionados para receber tratamento com PVP-I a 10%. Somente um dos molares ligados recebeu tratamento (lado teste), enquanto o outro lado recebeu apenas indução da doença periodontal (lado controle). A escolha do lado teste e do controle foi feita aleatoriamente por sorteio.

Após 7 dias da indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados e com o auxílio de uma gaze, realizou-se um isolamento relativo na região lingual dos primeiros molares ligados a fim de que não houvesse escoamento do antisséptico para o lado antagonista ou que o mesmo fosse deglutido pelo animal. Em seguida, 5 gotas da solução de PVP-I 10% (equivalente a 250µl) foram aplicadas sobre a ligadura de forma que essa fosse totalmente embebida pelo antimicrobiano. Aguardou-se um tempo de ação de 1 minuto do produto. Esse procedimento foi realizado nos períodos de 7, 14 e 21 dias após a colocação da ligadura. No 21º dia, após a aplicação da terapia, os animais foram sacrificados e as hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras coletadas para análises microbiológicas através de cultura.

- ***Clorexidina a 0,12%***

Oito animais receberam tratamento com CLX a 10%. Somente um dos molares ligados recebeu tratamento (lado teste), enquanto o outro lado recebeu apenas indução da doença periodontal (lado controle). A escolha do lado teste e do controle foi feito aleatoriamente por sorteio.

Após 7 dias da indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados e com o auxílio de uma gaze, realizou-se um isolamento relativo na região lingual dos primeiros molares ligados a fim de que não houvesse escoamento do antisséptico para o lado antagonista ou que o mesmo fosse deglutido pelo animal. A solução utilizada foi preparada em farmácia de manipulação (Proderma, Piracicaba, São Paulo) e assim como a aplicação do PVP-I, foram aplicadas 05 gotas da solução sobre a ligadura de forma que esta fosse totalmente embebida pelo antimicrobiano. Esperou-se um tempo de ação de 1 minuto do produto. Esse procedimento foi realizado nos períodos de 7, 14 e 21 dias após a colocação da ligadura. No 21º dia, após a aplicação da terapia, os animais foram sacrificados e as hemimandíbulas foram obtidas para realização

dos procedimentos histológicos e as ligaduras coletadas para análises microbiológicas através de cultura.

- ***Terapia Fotodinâmica***

Dez animais foram selecionados para receber tratamento com TFD. Somente um dos molares ligados recebeu tratamento (lado teste), enquanto o outro lado recebeu apenas indução da doença periodontal (lado controle). A escolha do lado teste e do controle foi feita aleatoriamente por sorteio.

*Fonte de luz*

O equipamento utilizado nesse experimento como fonte de luz foi um aparelho tipo LED, desenvolvido pelo Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica e Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos/SP, Brasil. O aparelho emitia luz azul com comprimento de onda de 450nm, potência de 310mW e poder de densidade de 122,04mW/cm<sup>2</sup>.

*Fotossensibilizador*

O fotossensibilizador utilizado no estudo foi à base de Curcumina 10%. Essa foi inicialmente diluída em água destilada segundo informações do fabricante (PDT – Pharma, Cravinhos, Brasil). Cada sachê continha 66,7% de N-metil-D-glutamina; 17,8% de curcumina e 15,5% de demais curcuminóides. Uma vez diluído o sal de curcumina, a solução foi acondicionada em frascos âmbar envoltos em papel alumínio para que não sofressem influência da luz ambiente.

Após 7 dias da indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados e com o auxílio de uma gaze, realizou-se um isolamento relativo na região lingual dos primeiros molares ligados a fim de que não houvesse escoamento do antisséptico para o lado antagonista ou que o mesmo fosse deglutido pelo animal. Em seguida, cinco gotas da solução de Curcumina 10%



foram aplicadas sobre a ligadura e aguardou-se um tempo de pré-irradiação de 1 minuto (Figura 5).

Após esse período, a luz do LED foi incidida sobre a ligadura por mais 1 minuto para que ocorresse a fotoativação do fotossensibilizador (Figura 6) e em seguida o excesso da solução de curcumina foi removido com um pedaço de gaze para evitar que a solução fosse posteriormente deglutida pelo animal. Esse procedimento foi realizado nos períodos de 7, 14 e 21 dias após a colocação da ligadura. No 21º dia, após a aplicação da terapia, os animais foram sacrificados e as hemimandíbulas foram obtidas para realização dos procedimentos histológicos e as ligaduras coletadas para análises microbiológicas através de cultura.



**Figura 5** – Aplicação de 5 gotas (250µl) de Curcumina 10% sobre a ligadura no primeiro molar com isolamento relativo na região lingual



**Figura 6** – Fotoativação da Curcumina 10% com luz LED azul por 1 minuto, após a pré-irradiação.

#### **4.3. Sacrifício dos Animais e Processamento Histológico**

Os animais foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de 1ml/kg de ketamina (Dopalen; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brazil) e 0,3 ml/kg de cloridrato de xylazina (Virbaxil; Virbac do Brazil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil). Os animais foram sacrificados por decaptação e a mandíbula foi removida e separadas em sua sínfise. As hemimandíbulas foram imersas em formol a 10% com tampão fosfato (pH 7,0) por 24 horas e depois foram descalcificadas em EDTA 20%, com 1 troca diária da solução, durante 45 dias, à temperatura ambiente. Após a desmineralização, os espécimes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Secções longitudinais méso-distais de 6  $\mu$ m de espessura foram obtidas da região dos molares com auxílio de um micrótomo (Leica RM2155, Alemanha) e os cortes foram colocados em lâminas de vidro.

#### 4.4. Análise histométrica

Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina (HE). Dez cortes histológicos equidistantes foram selecionados por dente para avaliação histométrica. Os cortes obtidos foram digitalizados em um aumento de 50X (5X objetiva e 10X ocular). A imagem de cada lâmina foi capturada por uma câmera digital (MC80 DX®, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada em microscópio óptico (Axioskop 2 plus®, Zeiss, Jena, Alemanha), utilizando o programa Leica Application Suite (Leica Microsystems, Suíça).

Utilizando-se o sistema de pontos de um retículo quadriculado com auxílio do programa Image-Pro® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), foram obtidas as medidas da perda óssea na área de furca de cada dente (área de tecido conjuntivo proveniente da reabsorção do tecido ósseo da região inter-radicular). O retículo foi constituído de quadrados de 0,08mm de aresta e 0,0064mm<sup>2</sup> de área. O retículo foi posicionado de maneira que sempre incluísse dentina coronária e radicular e o tecido ósseo, sendo computados os pontos que coincidiam com as intersecções das arestas dos quadrados adjacentes que ficavam dentro da área de tecido conjuntivo presente na região inter-radicular em consequência da perda óssea (Figura 7). A área de reabsorção óssea foi calculada utilizando-se a fórmula *Área reabsorvida = N° de pontos x Área do quadrado*. A área de reabsorção óssea da região de furca foi determinada a partir da média das leituras dos 10 cortes eqüidistantes por dente, expressa em mm<sup>2</sup>.

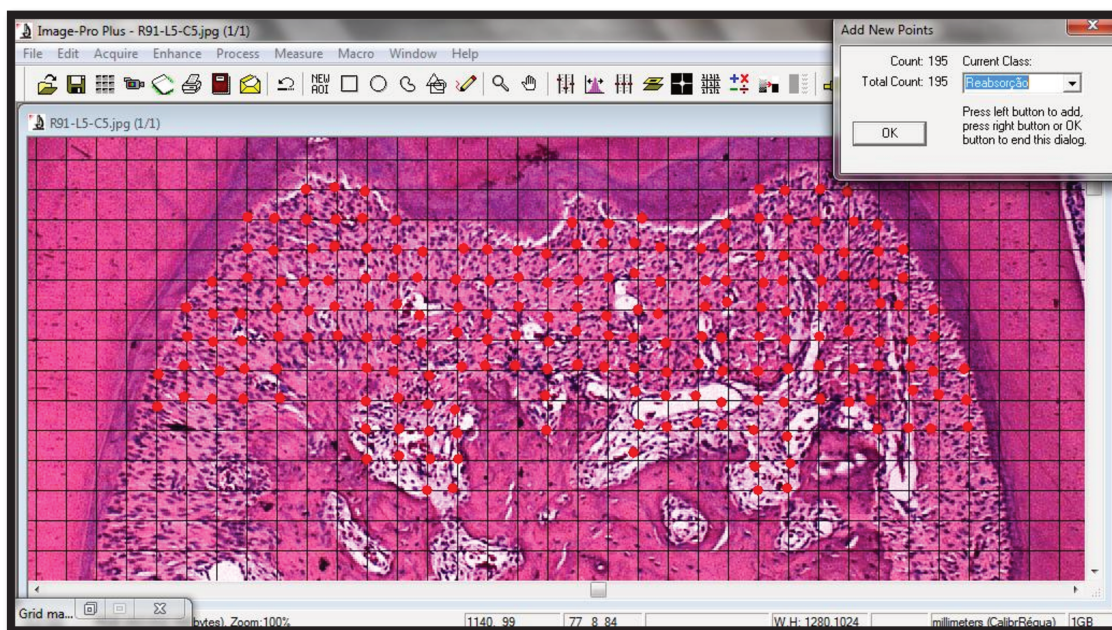


Figura 7 – Imagem digitalizada do corte histológico com retículo quadriculado posicionado sobre a região interradicular e contagem dos pontos realizada. A região delimitada por pontos vermelhos descrevem a área preenchida por tecido conjuntivo do ligamento periodontal.

#### 4.5. Análise histoquímica para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP)

Secções méso-distais de 6µm de espessura foram desparafinizadas e foram incubadas a 37°C durante 15 min com uma mistura de 4 mg de Naftol AS-BI fosfato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), como substrato, e 24mg de sal violeta vermelho (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) diluído em 30mL de tampão de acetato (pH 5,2) contendo 0,3 tartarato mmol/L (Sigma), pH 5,0. Para lâminas de controle, o substrato foi omitido. As secções foram contra-coradas com fast green. A análise quantitativa do número de osteoclastos marcados positivamente pela enzima fosfatase ácida tartarato resistente foi realizada na superfície linear da crista óssea, imediatamente abaixo do teto da furca dos primeiros molares usando um microscópio óptico (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Alemanha), com aumento original de 400X (objetiva de 40X e ocular 10X). Os resultados foram descritos como o número de células positivas para a TRAP/mm.

#### 4.6. Cultura dos microrganismos totais

As ligaduras coletadas de cada grupo foram colocadas em 450µl de meio de transporte fluido reduzido (RTF) (Syed & Loesche, 1972) e armazenadas para alíquotagem. As amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 2 minutos para que houvesse o total desprendimento do biofilme da ligadura e sua dispersão. Então, 50µl da suspensão foram retirados e diluídos em série decimal de  $10^{-1}$  a  $10^{-13}$  em eppendorfs contendo 450µl de RTF. Posteriormente, alíquotas de 25µl de cada uma das diluições foram inoculadas em triplicata diretamente na superfície do meio de cultura ágar sangue (*Brucella Agar with Hemin and Vitamin* - Sigma cat#B2926 - suplementados com 5% de sangue desfibrinado de carneiro). As placas foram então incubadas a 37°C, em câmara de anaerobiose (atmosfera de 80% N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 10% H<sub>2</sub>) por 48 horas, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) no contador manual (Contador de colônias CP 600 - Phoenix).

#### 4.7. Análise estatística

Para análise da atividade antimicrobiana da TFD, da CLX e do PVP-I sobre o biofilme dentário, inicialmente, a fim de promover a normalização dos dados, a análise estatística foi feita com os dados transformados em log<sub>10</sub>. Isso significa dizer que a cada 1 log de redução houve uma redução microbiana de 10 vezes. Redução a partir de 1 log foi considerado com significância biológica. Para determinar se houve diferença entre os grupos teste e os grupos controle, utilizou-se o teste *t de Student*.

Para análise histométrica e histoquímica, médias representativas de cada animal foram obtidas após os dados serem adquiridos. Os dados de reabsorção óssea alveolar e a contagem de células TRAP-positivas foram, inicialmente, avaliados quanto à homogeneidade pelo teste de Shappiro-Wilk. Tendo detectado a heterogeneidade, para análise intragrupo foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney e para avaliação intergrupo foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis.

O programa estatístico utilizado para realização das análises foi o BioStat 5.0<sup>®</sup> e o nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%.

## 5. RESULTADOS

Na avaliação histométrica dos grupos teste (Figuras 11A, 11C e 11E) e controle (11B, 11D e 11F) de todas as terapias utilizadas, após os 21 dias do estudo, foi possível observar uma área de reabsorção óssea alveolar preenchida por tecido conjuntivo na região do teto da furca, indicando uma reabsorção do osso alveolar provocado pela indução da doença periodontal. Contudo, não foram verificadas diferenças intragrupo no padrão de reabsorção alveolar em todos os grupos ( $p>0,05$ ) indicando que nenhuma das terapias foi capaz de impedir a reabsorção alveolar na região de furca dos primeiros molares dos animais, após 21 dias (Tabela 1). A comparação entre as terapias também revelou não haver diferença estatística ( $p>0,05$ ) (Tabela 1).

Após análise dos cortes que foram submetidos à histoquímica para marcação de TRAP, foi observado que todos os grupos apresentaram células marcadas positivamente para TRAP na região superficial do osso alveolar dos primeiros molares analisados. Após análise comparativa para avaliação intergrupo e intragrupo, foi observado que o grupo da TFD tinha menos células TRAP-positivas na região da superfície óssea alveolar, em comparação com o grupo controle e o grupo da CLX ( $p<0,05$ ), enquanto que o grupo PVP-I não obteve diferença significativa nem quando comparado com o grupo controle e a CLX nem quando comparado à TFD ( $p>0,05$ ). No grupo da CLX também não houve diferença estatística quando comparada ao seu respectivo grupo controle (Figuras 12A a 12F e Tabela 2).

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da área de reabsorção óssea nos grupos PVP-I, CLX , TFD e seus respectivos grupos controle e CN

| Grupos       | Reabsorção óssea                                  |                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|              | <i>Média<br/>Tratamento (<math>\pm dp</math>)</i> | <i>Média<br/>Controle (<math>\pm dp</math>)</i> |
| <b>PVP-I</b> | 1.3 $\pm$ 0.3 Aa                                  | 1.3 $\pm$ 0.4 Aa                                |
| <b>CLX</b>   | 1.1 $\pm$ 0.2 Aa                                  | 1.4 $\pm$ 0.2 Aa                                |
| <b>TFD</b>   | 1.2 $\pm$ 0.5 Aa                                  | 1.1 $\pm$ 0.1 Aa                                |

Letras minúsculas distintas na horizontal indicam que não há diferença estatística intragrupo. Letras maiúsculas iguais na vertical indicam que não há diferença significativa intergrupo (Kruskall-Wallis/Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

**Tabela 2.** Média e desvio padrão do número de células TRAP positivas, nos grupos PVP-I, CLX , TFD e seus respectivos grupos controle e controle negativo.

| Grupos       | TRAP                                              |                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|              | <i>Média<br/>Tratamento (<math>\pm dp</math>)</i> | <i>Média<br/>Controle (<math>\pm dp</math>)</i> |
| <b>PVP-I</b> | 4.2 $\pm$ 2.9 Aa                                  | 5.6 $\pm$ 2.6 Aa                                |
| <b>CLX</b>   | 5.0 $\pm$ 2.6 Aa                                  | 5.4 $\pm$ 2.8 Aa                                |
| <b>TFD</b>   | 2.8 $\pm$ 3.0 Aa                                  | 6.8 $\pm$ 4.5 Ab                                |

Letras minúsculas distintas na horizontal indicam que não há diferença estatística intragrupo. Letras maiúsculas iguais na vertical indicam que não há diferença estatisticamente significativa intergrupo (Kruskall-Wallis/Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

Na avaliação da atividade antibacteriana da TFD, do PVP-I e da CLX, sobre o biofilme dentário, observou-se que os três agentes mostraram um efeito antimicrobiano sobre os microrganismos totais (Figura 13). No grupo do PVP-I foi observada uma média de redução de 1.8 logs (18 vezes) da contagem bacteriana, com uma máxima capacidade de redução de 68 vezes. No grupo da CLX essa redução foi de 1.9 logs (19 vezes), com uma máxima redução de 73 vezes. Já no grupo da TFD, a redução da contagem bacteriana foi, em média, 0,4 logs (4 vezes), apresentando uma máxima redução de 37 vezes (Tabela 3).

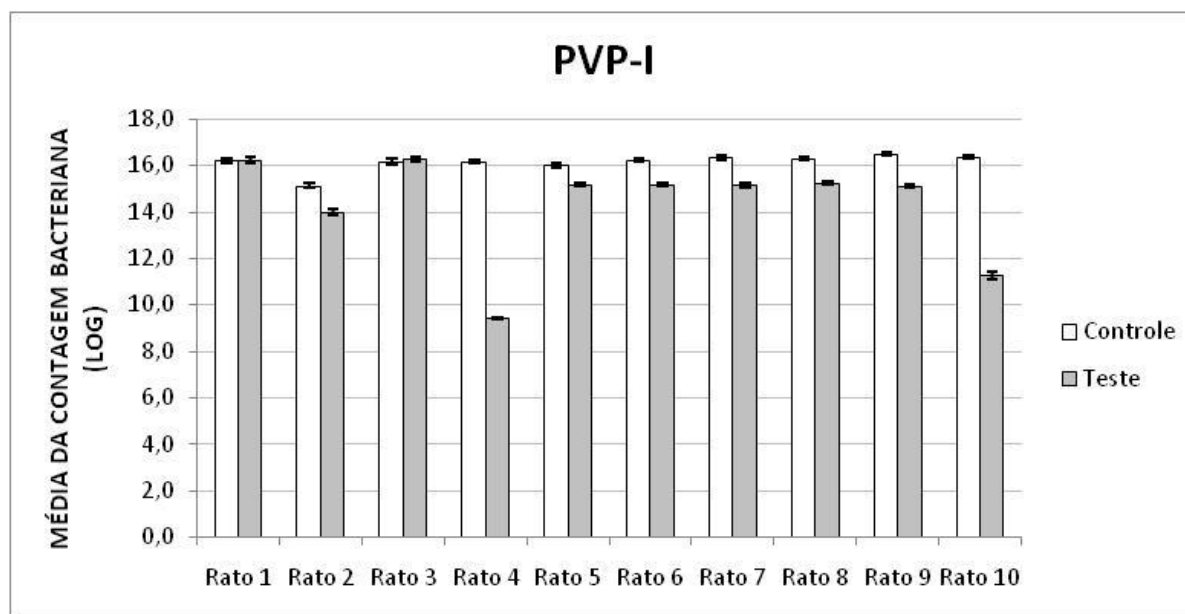
Como terapia, os molares tratados com PVP-I apresentaram significativa redução na carga microbiana (8 de 10,  $p=0,03$ ), apontando uma boa efetividade do tratamento (Figura 8). Dentre os molares tratados com CLX, apenas 4



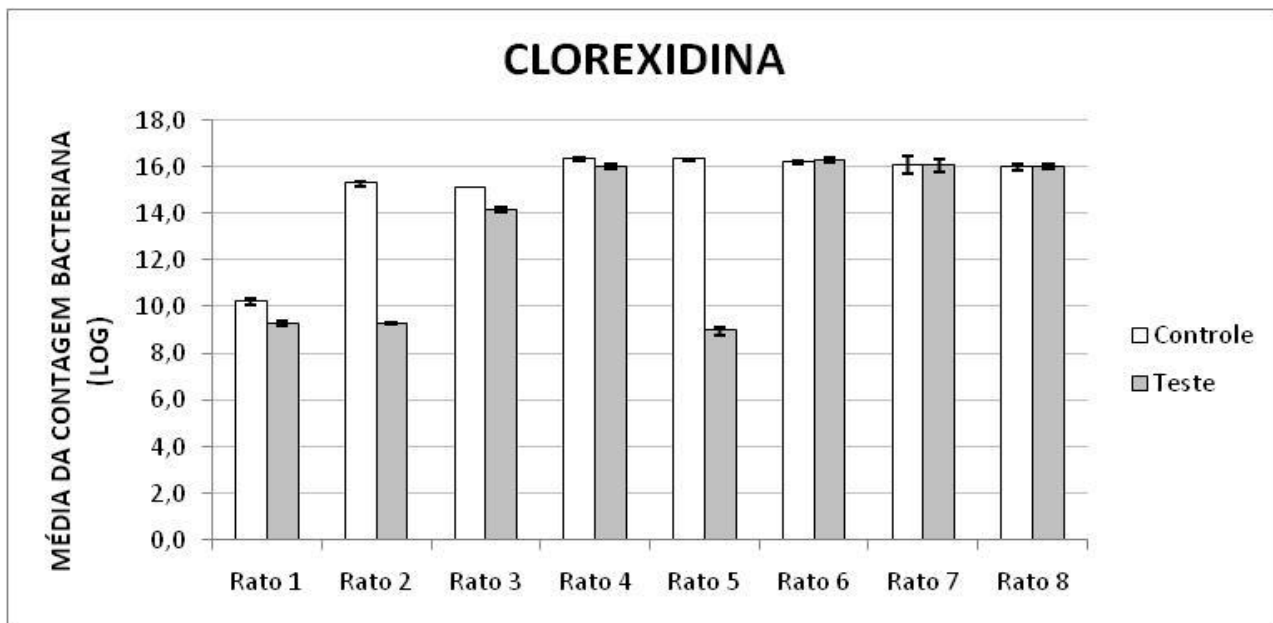
apresentaram significativa redução na carga microbiana (4 de 8,  $p=0,10$ ), mostrando uma tendência positiva para redução através dessa terapia (Figura 9). Já a TFD apresentou o efeito antimicrobiano apenas em alguns animais (4 de 10), porém sem diferença significativa entre molar tratado e não tratado ( $p=0,54$ ) (Figura 10). Sendo assim, considerando o número de molares que responderam positivamente ao tratamento, o PVP-I mostrou-se mais eficaz do que a CLX e a TFD, enquanto que a CLX foi mais eficaz do que a TFD.

**Tabela 3.** Médias de redução da contagem bacteriana por grupo ( $\log \pm dp$ ).

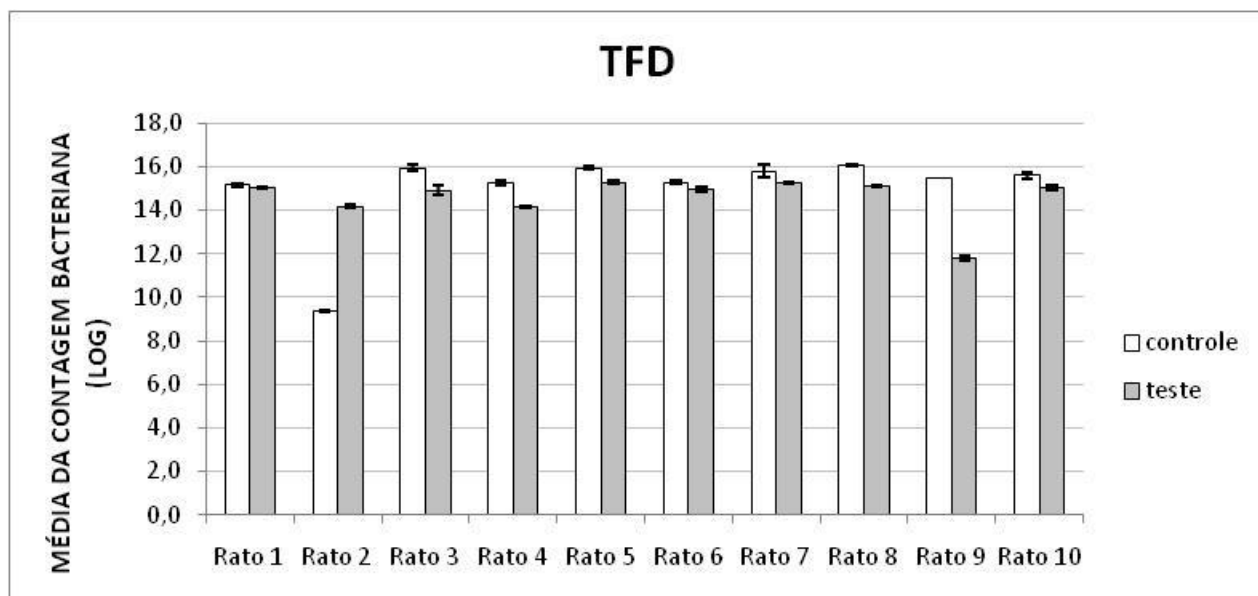
|              | <b>Média de redução<br/>da contagem<br/>bacteriana</b> | <b>Mínima<br/>Redução</b> | <b>Máxima<br/>Redução</b> |
|--------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>PVP-I</b> | 18x ( $\pm 23$ )                                       | 0x (n=2/10)               | 68x                       |
| <b>CLX</b>   | 19x ( $\pm 30$ )                                       | 0x (n=4/8)                | 73x                       |
| <b>TFD</b>   | 4x ( $\pm 21$ )                                        | 0x (n=6/10)               | 37x                       |



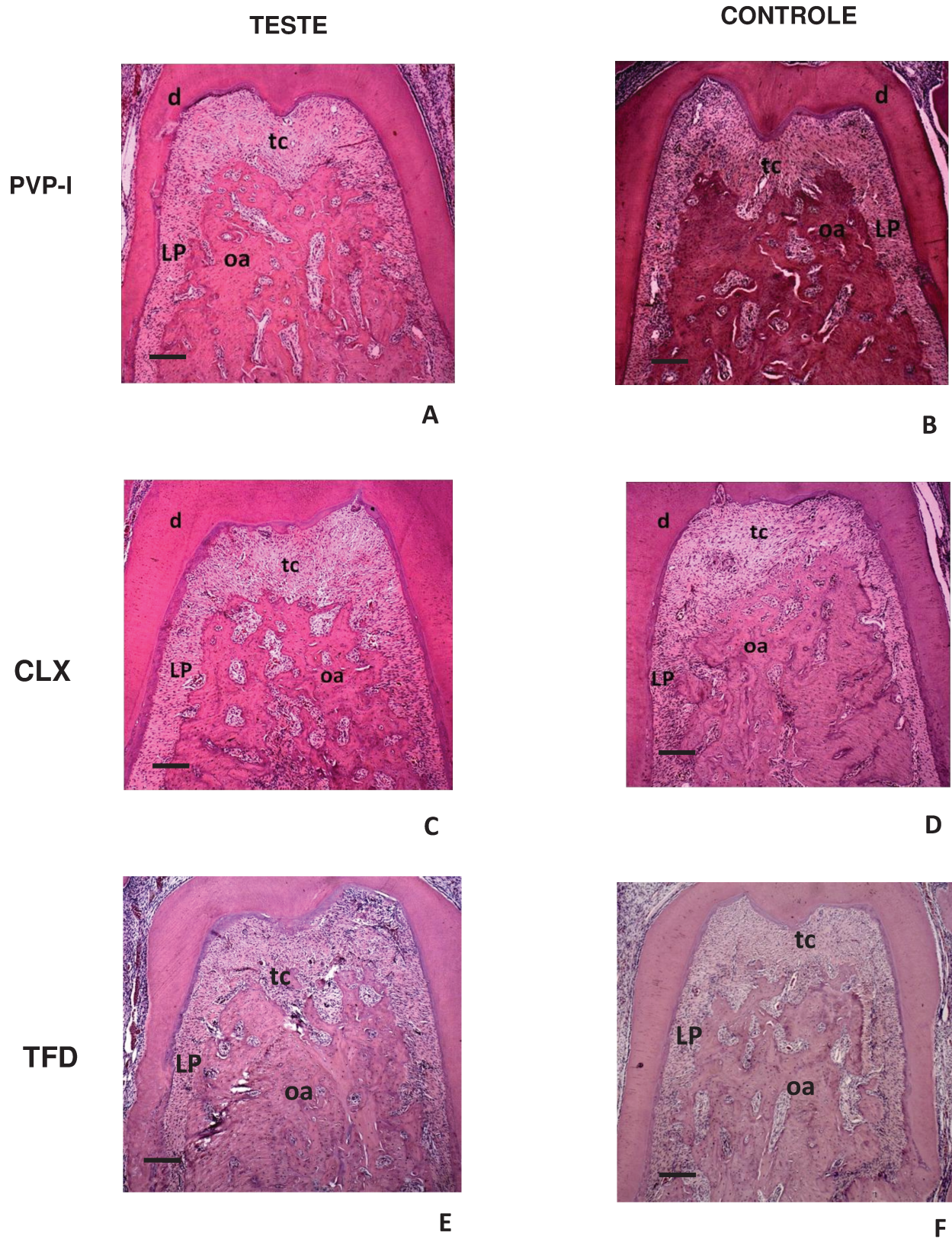
**Figura 8.** Médias da contagem bacteriana por rato no lado tratado com PVP-I e lado controle



**Figura 9.** Médias da contagem bacteriana por rato no lado tratado com CLX e lado controle

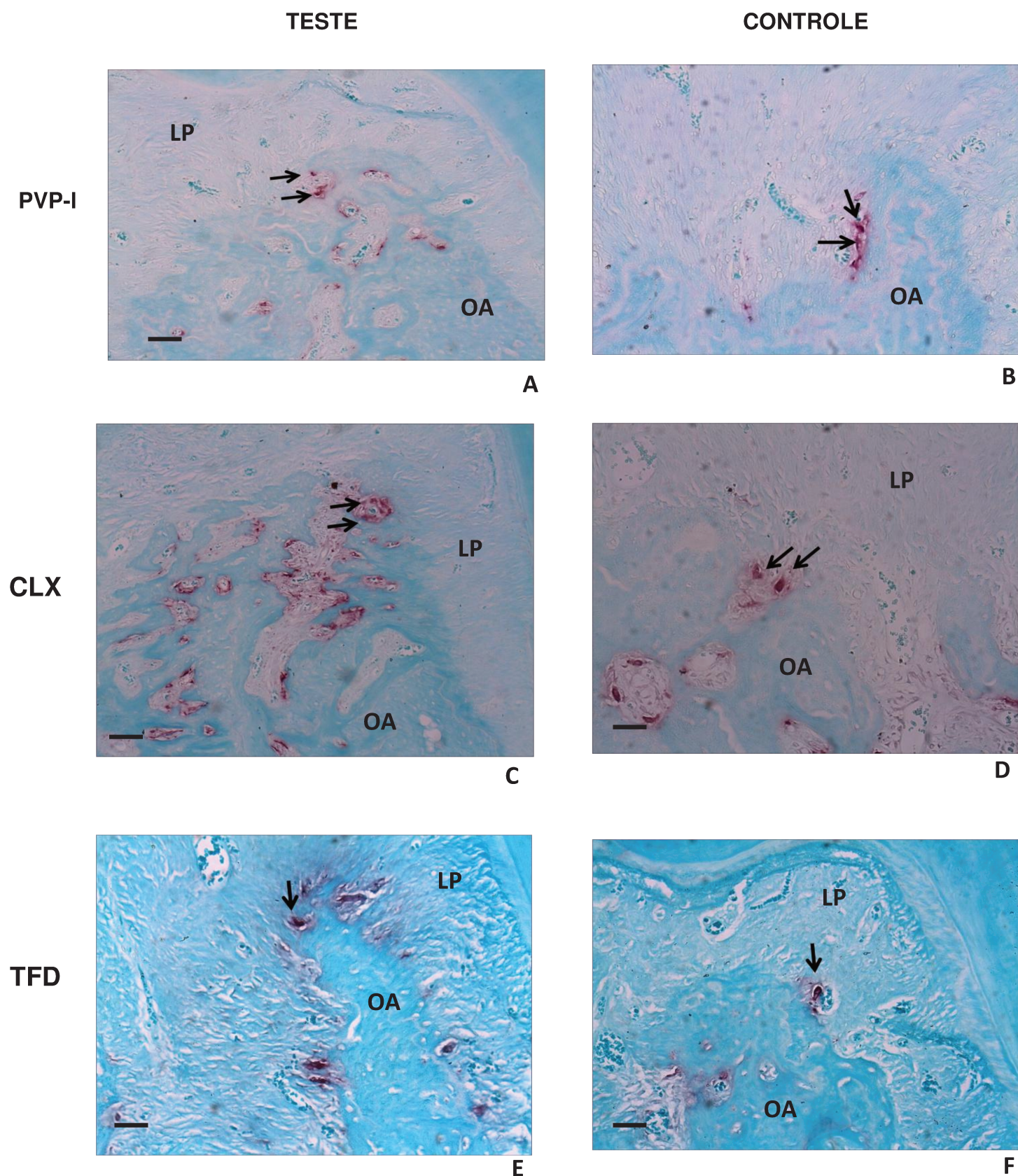


**Figura 10.** Médias da contagem bacteriana por rato no lado tratado com TFD e lado controle

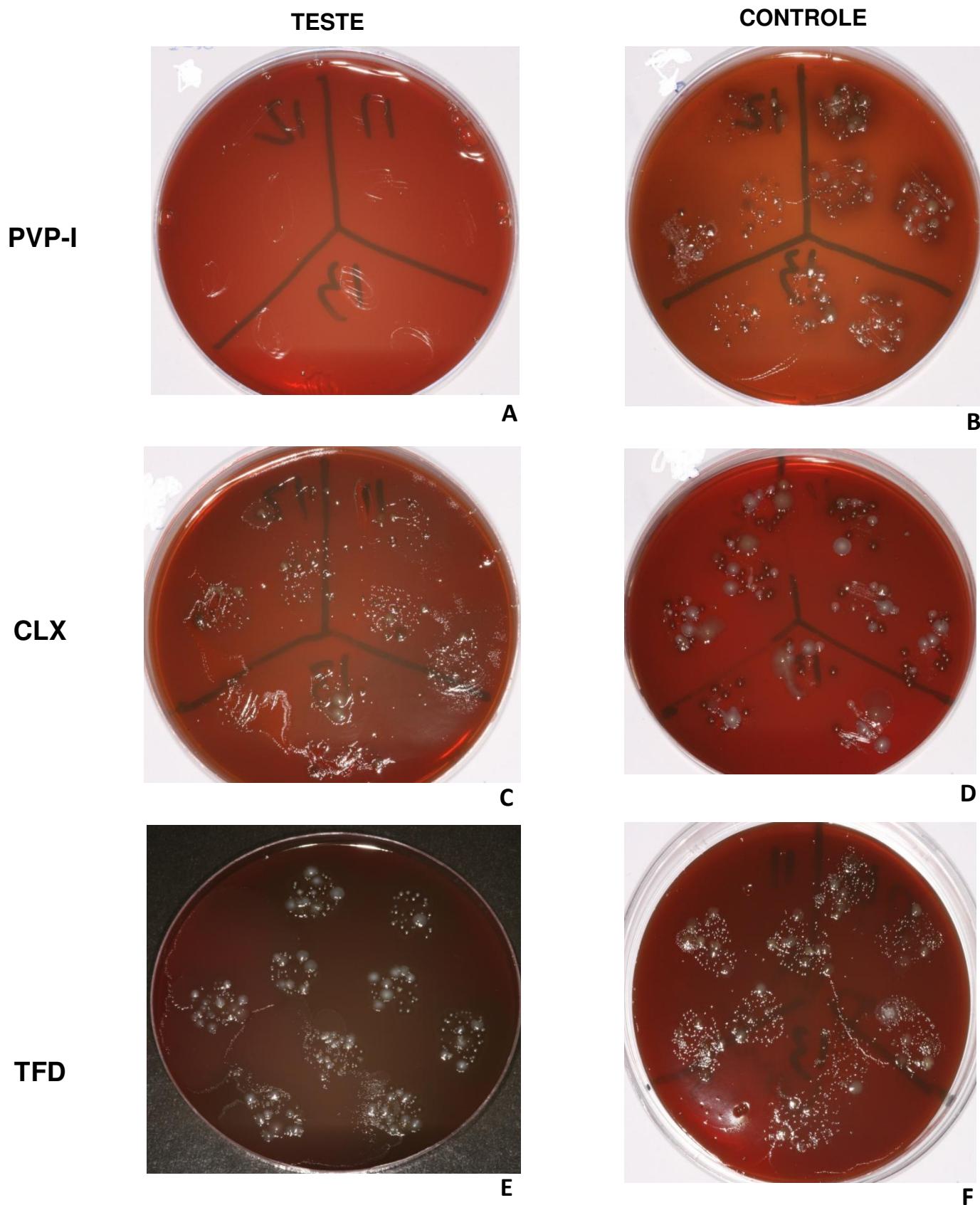


**Figura 11** – Cortes histológicos em aumento de 50X (objetiva de 5X e ocular de 10X) dos lados tratados com PVP-I, CLX e TFD (A, C e E respectivamente) e dos lados controle (B, D e F) em 21 dias de experimento. **d** – dentina; **tc**- tecido conjuntivo; **oa** – osso alveolar da furca; **LP** – ligamento periodontal; Barra = 200µm





**Figura 12.** Fotomicrografias representativas dos grupos testes (A, C, E) tratado com PVP-I, CLX e TFD, respectivamente e seus grupos controle (B, D, F), evidenciando células TRAP-positivas (setas) na região de superfície alveolar óssea dos primeiros molares com periodontite induzida. **LP:** ligamento periodontal, **OA:** osso alveolar. Aumento de 200X. Barra = 200µm



**Figura 13.** Imagens ilustrativas do crescimento das colônias bacterianas provenientes das ligaduras após a aplicação do PVP-I, da CLX e da TFD (A, C, E) e seus grupos controles (B, D, F).





## 6. DISCUSSÃO

A necessidade de procedimentos coadjuvantes à terapia periodontal convencional parece promover uma mobilização científica em busca de alternativas eficazes (Rosling *et al.*, 1983; 1986; Wennström, 1987; 1997; Verônica & Bissada, 1998; Ciancio, 1998; Van Steenberghe *et al.*, 1999). Embora o uso de antimicrobianos locais seja uma alternativa adjuvante eficiente na terapia periodontal não-cirúrgica, seus efeitos colaterais muitas vezes os impedem de serem utilizados a longo prazo. Tendo em vista a efetiva ação antimicrobiana da TFD (Sarkar & Wilson, 1993; Komerik *et al.*, 2000; Chan & Lai, 2003; Almeida *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008a,b; Polansky *et al.*, 2009), essa parece ser uma estratégia terapêutica alternativa promissora para utilização no controle do biofilme bucal, com mínimos efeitos colaterais locais e sistêmicos. Sendo assim, o presente estudo avaliou a ação da TFD utilizando curcumina a 10%, da CLX 0,12% e do PVP-I 10% na redução microbiana e a ação desses agentes na reabsorção óssea de dentes acometidos por periodontite experimental em ratos.

A aplicação de agentes antimicrobianos localmente tem trazido vantagens em relação à administração sistêmica como, efeitos adversos menores, baixa indução da resistência bacteriana, além de uma ação mais efetiva sobre as bactérias associadas ao biofilme (Goodson *et al.*, 1985; Quyrinen *et al.*, 2002; Slots, 2002; Mombelli *et al.*, 2005). O iodo povidine e a clorexidina são agentes antimicrobianos locais que têm apresentado bons resultados na redução da carga microbiana (Løe & Schiott, 1970; Bassiouny & Grant., 1975; Forabosco *et al.*, 1996; Cury *et al.*, 2000; Rosling *et al.*, 2001; Hoang *et al.*, 2003).

Nesse contexto, Nakagawa *et al.* (1990), em estudo *in vivo*, avaliando várias concentrações de PVP-I, mostraram atividade bacteriana significativa com a solução não diluída do antimicrobiano (PVP-I 10%). Os resultados microbiológicos mostrados no presente estudo, corroboram com os achados de Nakagawa *et al.* (1990) frente à redução significativa da carga microbiana apresentada pelo PVP-I 10% quando comparado ao grupo controle ( $p=0,03$ ) e aos grupos CLX e TFD.

Os resultados do presente estudo sugerem ainda que o PVP-I em altas concentrações (PVP-I 10%), mesmo sem uma desorganização mecânica do biofilme, é eficaz para exercer um efeito nesses microrganismos, com um tempo de contato mínimo de 1 minuto. Isso foi observado também por Hosaka *et al* (2012), que investigaram a atividade antimicrobiana do PVP-I em biofilmes de *Pg* e *Fn*. Os resultados mostraram que o PVP-I em concentrações iguais ou maior que 2% foram necessárias para reduzir significativamente os biofilmes de *Pg* e de *Fn* a partir de 1 minuto de contato, e que concentrações acima de 5% erradicaram completamente todas as bactérias. Os autores observaram ainda, que com um tempo de contato de 1 minuto houve morte bacteriana significativa, e a partir desse tempo não foi observado nenhuma diferença na atividade antimicrobiana do PVP-I em qualquer concentração.

A CLX é considerada uma substância “padrão-ouro” no controle do biofilme dentário e da gengivite. Inúmeros trabalhos já foram realizados e comprovaram a sua eficácia contra microrganismos da cavidade bucal, demonstrando uma boa redução no biofilme quando comparada com soluções controle (Løe & Schiott, 1970; Bassiouny & Grant., 1975; Løe *et al.*, 1976; Addy & Moran, 1983; Briner *et al.*, 1986; Segreto *et al.*, 1986; Sinnes *et al.*, 1997; Cury *et al.*, 2000). No entanto, a sua ação sobre um biofilme maduro parece não ser tão eficaz (Cumming & Løe, 1973; Brownstein *et al*, 1990; Pratten *et al.*, 1998; Zaura-Arite *et al.*, 2001).

Zaura-Arite *et al.* (2001) verificaram pela primeira vez o comportamento do biofilme oral após exposição a uma solução de clorexidina 0,2% por 1 minuto, utilizando a microscopia confocal a laser. A análise em camadas mostrou que a camada mais externa do biofilme apresentou, estatisticamente, menor vitalidade bacteriana que a camada mais interna, tanto em 24 quanto em 48 horas, deixando clara a ineficácia da clorexidina nas camadas mais internas de biofilme com mais de 24 horas de formação. Assim como no trabalho de Zaura-Arite *et al.*, (2001), o presente estudo também não verificou uma efetividade da CLX sobre o biofilme formado após 21 dias de estudo.



Um dos fatores que pode explicar essa ineficácia da CLX sobre o biofilme nesse estudo é o tempo de ação do antimicrobiano aplicado sobre os microrganismos. Isso foi observado por, Pratten *et al.* (1998) em um trabalho *in vitro*, no qual os autores avaliaram a eficácia da clorexidina sobre a vitalidade de bactérias agrupadas em biofilmes. Os autores observaram que a CLX mostrou uma redução na vitalidade bacteriana significativa somente após 60 minutos de exposição ao antimicrobiano. Provavelmente, o tempo de 1 minuto aplicado no presente estudo, não foi suficiente para que o antimicrobiano agisse nas camadas mais internas do biofilme.

O sucesso da TFD na eliminação de microrganismos o indica como uma terapia para infecções microbianas localizadas, como a doença periodontal (Jori, 2006; Komerik & Macrobert, 2006). Nos últimos anos foi publicado um grande número de estudos, que descrevem a morte de bactérias periodontopatogênicas através da TFD (Sarkar & Wilson, 1993; Komerik *et al.*, 2000; Chan & Lai, 2003; Komerik *et al.*, 2003; Sigush *et al.*, 2005; Souza, 2007; De Almeida *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008a,b; Polansky *et al.*, 2009).

No entanto, da mesma forma como ocorre com a CLX, diversos estudos têm mostrado que a TFD quando realizada sobre superfícies dentárias com biofilme presente não apresenta um efeito antimicrobiano terapêutico significativo (De Beer *et al.*, 1994; Soukos *et al.*, 2003; Spratt *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2009).

Fontana *et al.* (2009), avaliaram a habilidade da TFD, utilizando azul de metileno (5 minutos de pré-irradiação e 5 minutos de exposição à luz), em reduzir o número de bactérias orais, comparando os efeitos da TFD em microrganismos planctônicos e em biofilme. A TFD eliminou aproximadamente 63% das bactérias presentes na suspensão, enquanto que em biofilme a terapia teve um efeito menor na viabilidade das bactérias, eliminando no máximo 32% dos microrganismos. Os autores concluíram então que as bactérias orais em biofilmes são menos afetadas pela TFD do que em microrganismos planctônicos.

O protocolo usado nesse estudo, utilizando TFD com curcumina a 10% e luz LED com comprimento de onda de 450nm, não foram efetivos na redução

microbiana, corroborando com os achados de Fontana *et al.*, (2009), embora os protocolos utilizados tenham sido diferentes. Diversos fatores podem ter influenciado esse resultado, dos quais pode-se citar: as características peculiares do biofilme formado, a variação individual de cada animal, a falta de penetração do corante e da luz em toda a profundidade do biofilme e o tempo de pré-irradiação e de irradiação insuficientes.

Com o objetivo de conhecer o efeito do azul de toluidina na TFD, Qin *et al.*, (2008) coletaram amostras de placa supragengival de 20 pacientes para análise das bactérias *Leptotrichia buccalis* (Lb), *Vignal's bacillus* (Vn), *Veillonella* (V), *Streptococos* (S) e *Aa*. A morte de 47% a 99% das bactérias foi obtida pela combinação do azul de toluidina (1mg/ml) seguida da exposição ao laser diodo (635nm; 212mW/cm<sup>2</sup>; 12J/cm<sup>2</sup>; 57 segundos). Os autores sugeriram que a TFD é eficiente para destruir bactérias supragengivais, mas essa eliminação varia de um paciente para o outro.

Dahl *et al.*, (1989) em um estudo sobre fototoxicidade da curcumina, mostraram que as bactérias gram-negativas apresentaram maior resistência à fototoxicidade da curcumina em relação às bactérias gram-positivas. Essa característica peculiar do biofilme pode ter contribuído para o insucesso na efetividade da TFD, sugerindo que no biofilme maduro, avaliado no estudo, pode ter ocorrido um aumento de bactérias gram-negativas, dificultando a ação da TFD.

O tempo de pré-irradiação da curcumina mediada pela TFD em culturas planctônicas e biofilme de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis* foi avaliado em 2013, por Andrade e colaboradores. Os autores avaliaram os efeitos do tempo de pré-irradiação na efetividade da TFD. As culturas de biofilmes mostraram redução significativa na viabilidade celular com a associação de 40µM de curcumina e 20 minutos de pré-irradiação. Além disso, as observações da microscopia a laser confocal mostraram diferentes intensidades de emissões de fluorescência após 5 e 20 minutos de incubação. Os autores concluíram que existe uma dependência do tempo de pré-irradiação nas culturas de biofilme e esta difere entre as espécies avaliadas. Também, as observações da

microscopia confocal confirmaram a necessidade de um maior intervalo de tempo para a curcumina penetrar as camadas mais internas do biofilme. O tempo de pré-irradiação da curcumina utilizado no presente estudo, foi de 1 minuto, o que pode ter sido insuficiente para penetração do fotossensibilizador em camadas mais profundas do biofilme.

Esse mesmo resultado foi encontrado por Dovigo *et al.*, (2011) que avaliaram a viabilidade de utilização da curcumina como agente fotossensibilizador na TFD para inativação de uma cepa padrão de *Candida albicans* e seu efeito sobre células de macrófagos, sob diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de pré-irradiação. Os resultados mostraram que houve uma redução significativa na viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans*. O efeito fotodinâmico foi acentuado pela presença da curcumina na concentração de 20µM e pela utilização de 20 minutos de pré-irradiação.

Da mesma forma que o tempo de pré-irradiação, outro fator que pode ter contribuído para uma ineficácia da TFD sobre o biofilme dentário, é o tempo de irradiação, ou seja, o tempo para interação da luz com o fotossensibilizador. Prates *et al* (2010), mostraram em um estudo sobre a influência dos parâmetros de irradiação na terapia fotodinâmica em leveduras (*Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*), que o tempo de irradiação e intensidade tem um papel importante na eficiência da TFD. Eles mostraram que quanto maior o tempo de irradiação e a intensidade da luz, maior é o efeito fotodinâmico sobre os microrganismos. O tempo de irradiação de 1 minuto utilizado no presente estudo, pode ter sido um tempo insuficiente para interação da luz com fotossensibilizador em camadas mais profundas do biofilme, o que justifica a ineficácia da TFD sobre os microrganismos totais avaliados.

Poucos estudos têm avaliado a ação dos três agentes avaliados no presente estudo, sobre a perda óssea alveolar *in vivo* (Komerik *et al.*, 2003; De Almeida *et al.*, 2007, 2008; Qin *et al.*, 2008a,b). No intuito de avaliar a ação da TFD na redução da perda óssea alveolar decorrente de periodontite Komerik *et al.*, (2003) inocularam *Pg* em ratos e os expuseram ao laser diodo (630nm; 0,1W;

6;12;24 e 48J; 1;2;4 e 8 minutos) na presença de azul de toluidina. A perda óssea encontrada nos animais tratados com TFD foi significativamente menor quando comparada ao grupo controle. Resultado semelhante foi encontrado por Almeida *et al.*, (2007, 2008), onde os autores demonstraram a ocorrência de menos perda óssea em animais tratados com esse procedimento. No presente estudo, os resultados obtidos na avaliação histométrica vão de encontro aos resultados encontrados nos trabalhos de Komerik *et al* (2003) e Almeida *et al* (2007, 2008). Após avaliação do presente estudo, verificou-se que nenhuma das três terapias utilizadas foram capazes de impedir a reabsorção óssea alveolares primeiros molares dos ratos.. Uma das razões que possivelmente explica esse resultado é a presença do biofilme maduro. Possivelmente, a presença do biofilme e a impossibilidade das terapias testadas em alcançar as camadas mais internas desse biofilme, impossibilitou que os tratamentos pudessem reverter a destruição periodontal.

No entanto, quando avaliada histoquimicamente, a TFD mostrou um melhor resultado na contagem de células TRAP positivas quando comparada aos outros grupos. A TFD pode favorecer o processo de reparo quando associado com terapia à laser de baixa potência, que tem como vantagem promover a biomodulação no tecido a ser reparado e reduzir a inflamação do tecido periodontal (Qadri *et al.*, 2005). No presente estudo, a utilização da curcumina associado ao LED, pode ter apresentado um efeito imunomodulador do processo inflamatório. Isso já foi mostrado por Carvalho *et al.*, (2001), que afirmaram que a curcumina possui efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e imunomoduladores que poderiam ser exacerbados com sua iluminação em comprimento de onda adequado.

Sendo assim, em vista dos resultados apresentados no presente estudo, a presença de um biofilme maduro parece ser o fator fundamental no insucesso desses agentes como terapia, o que pode-se sugerir então, que a desorganização do biofilme pela intervenção mecânica parece ser um requisito essencial para efetividade dessas terapias sobre os tecidos periodontais.

Uma das limitações do presente estudo é que a aplicação das terapias foi realizada somente após 7 dias da indução da periodontite experimental. Com isso, pode-se sugerir que a reabsorção tenha ocorrido nesse período, não podendo avaliar se os tratamentos impediram a progressão da doença periodontal. Para isso, são necessários estudos que realizem essa avaliação em diferentes tempos.

Além disso, outros fatores precisam ser investigados a fim de definir um protocolo adequado para a terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando a curcumina como fotossensibilizador, como os tempos de pré-irradiação adequado, tempo de irradiação da luz, bem como, avaliar os efeitos citotóxicos da curcumina nos tecidos do hospedeiro.



## **7. CONCLUSÃO**

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que os três agentes antimicrobianos foram capazes de reduzir o número de microrganismos, sendo o PVP-I o mais eficaz. Com relação à reabsorção óssea, nenhuma das três terapias avaliadas mostraram-se capazes de impedir a reabsorção óssea alveolar, embora com a TFD um menor número de células TRAP positivas foram observadas.





## REFERÊNCIAS\*

Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*, 1999. 39(1): 41-47.

Ackroyd R; Kelty C; Brown N; Reed M. The history of photodetecton and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74:656-669.

Addy M, Wright R. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of povidine iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1978;5(3):198-205.

Addy M, Moran JM. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. *J Clin Periodontol*. 1983;10(1):69-71.

Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered anti-microbials. A short review. *J Clin Periodontol* 1986; 13:957-964.

Addy M, Moran JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol* 2000 1997 Oct; 15:52-54.

Addy M. Anti-sépticos na Terapia Periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 332-349.

Adriaens PA, De Boever, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol* 1988, 59: 222.230.

Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, Camnitz P, Brodish B, Sibata CH. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers – a review of applicattions and outcomes. *Photodiagn Photodyn Ther* 2005;2:2-5-222.

Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol*. 2006 Feb;2(1):53-71.

American Academy of Periodontology. Position Paper: The role of supra and subgingival irrigation in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11):2015-27.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. J Clin Dent 2007 18(2):34-8.

Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, *et al.* Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida spp.* Arch Oral Biol 2013; 58:200-210.

Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. Photom Laser Sur 2012b;30(2):96-101.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VC, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. Photom Laser Sur 2012a;30(7):393-9.

Axelsson P, Lindhe J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal diseases in adults. J Clin Periodontol. 1978, 5: 133-151.

Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. J Clin Periodontol. 1981 Feb; 8(1): 57-72.

Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy II. J Clin Periodontol. 1984; 11: 63-76.

Baptista A, Prates RA, Kato IT, Amaral MM, Freitas AZ, Ribeiro MS. Photodynamic therapy on bacterial reduction in dental caries: in vivo study. Proceedings Paper 2010 May; 7715.

Bassiouny MA, Grant AA. The toothbrush application of chlorhexidine – A Clinical Trial. J Brit. Dent. 1975;139:323-327.

Ben-Hur E, Malik Z, Dubbelman TMAR, Margakon P, Ali H, Van Lier JE. Phtalocyanine-induced photohemolysis: structure-activity relationship and the effect of fluoride. Photochem. Photobiol. 1993;58(3):351-55.

Berkelman RL, Holland BW, Anderson RL. Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. J Clin Microbiol 1982; 4(15): 635-9.

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitizations of porphyromonas gingivalis in vitro. Photochem Photobiol 1997, 65:1026-103

Bidault P, Chandad F, Grenier D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. J. Canad Dental Assoc. 2007; 73(8):721-725.

Bonesvoll P, Lökken P, Rølla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1974;19(11):1025-9.

Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1978;23(4):289-94.

Borissevitch L, Schaberle FA. Fotoquimioterapia – um novo método de tratamento de doenças graves. Princípios Básicos. Disponível em URL:<http://dfm.ffclrp.usp.br/fabio/fotoquimioterapia.htm>. Acesso em 17 de janeiro de 2013.

Briner WW, Grossman E, Buckner RY, Rebitski GF, Sox TE, Setse RE, et al. Assessment of susceptibility of plaque bacteria to chlorhexidine after six months' oral use. *J Periodontal Res* 1986; Suppl:53-59.

Brownstein CN, Briggs SD, Schweitzer KL, Briner WW, Kornman KS. Irrigation with chlorhexidine to resolve naturally occurring gingivitis. A methodologic study. *J Clin Periodontol* 1990;17(8):588-93.

Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RCV, Cirano FR, Saraceni CHC, Casati MZ. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2013 Jan;28(1):317-24.

Cancro LP, Klein K, Picozzi A. Dose response of chlorhexidine gluconate in a model in vivo plaque system. *J Dent Res* 1973; 52, Spec. issue, Abstr 659, 223.

Carranza FA, Newman MG. *Periodontia clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

Case DE. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. *J Clin Periodontol.* 1977;4(5):66-72.

Caufield PW, Allen DN, Childers NK. In vitro susceptibilities of suspected periodontopathic anaerobes as determined by membrane transfer assay. *Antimicrob Agents Chemother* 1987, 31(12):1989-1993.

Cavacante R, Imasato H, Bagnato V, Perussi J. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Phys Lett* 2009; 6:64-70.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.

Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000 Dec;27(12):903-7.

Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol* 1994; 59:295-302.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009 Spt; 24(5):681-688.

Christersson LA, Wikesjö UME, Albin B, Zambon JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol* 1987; 58: 540–545.

Christersson LA, Rosling BG, Dunford RG, Wikesjo UM, Zambon JJ, Genco RJ. Monitoring of subgingival *Bacteroides gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the management of advanced periodontitis. *Adv Dent Res*. 1988 Nov.;2(2):382–8.

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, et al. Photodynamic therapy as na adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical Trial. *J Periodontol* 2008;7(9):1638-44.

Ciancio S. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. *Adv Dent Res*. 1998; 12:27-31.

Clark WB, et al. Efficacy of Perimed® antibacterial system on established gingivitis. I. Clinical results. *J Clin Periodontol* 1989, 16(10):630-635.

Collins JG, Offenbacher S, Arnold RR. Effects of a combination therapy to eliminate *Porphyromonas gingivalis* in refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 10(64): 998-1007.

Couvarlin P. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob Chemoter* 1996 May; 37(5):855-869.

Cumming BR, Loe H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solution for the inhibitions of dental plaque. *J Periodontal Res* 1973; 8(2):57-62.

Cury JA, Rocha EP, KOO H, Francisco SB, Del Bel Cury, AA. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J* 2000; 11(1):29-34.

Dahl TA, MacGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol.* 1989; 151(2):183-185.

Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem Photobiol* 1994; 59:290-294.

Daniel MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust NZJ Surg* 1991;61:340-348.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6.

Davies RM, Hull PS. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in beagle dogs. *J Periodontal Res Suppl.* 1973;12:22-7.

De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78:566-575.

De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008 Jun;79:1081-1088.

De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol* 1994;60(12):4339-4344.

De Oliveira RR, Novaes AB Jr, Garlet GP, de Souza RF, Taba M Jr, Sato S, *et al.* The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci* 2011 May; 26(3):359-367.

Del Peloso ER, Bittencourt S, Ambroosano GM, Nociti FH Jr, Sallum EA, Sallum AW, *et al.* Povidone-Iodine used as an adjunct to non-surgical treatment of furcation involvements. *J Periodontol* 2006; 77(2):211-7.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992;37:883-887.

Doku HC, Shklar G, Bugbee B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966; 22(5): 569-577.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS, Jacomassi DP, et al., Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 2011;87: 895-903.

Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:104-108.

Drisko CH. Non-surgical pocket therapy: Pharmacotherapeutics. *Annals of Periodontology* 1996, 1:491–566.

Etienne D. Locally delivered antimicrobials for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2003; 9 Suppl 1:45-50.

Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo, Ed. Santos, 2005; 12:179-88.

Fleischer W, Reimer K. Povidone Iodine in antisepsis – state of the art. *Dermatology*. 1997; 70: 1397-1405.

Flemigson, Emmadi P, Ambalavanan P, Ramakrishanan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an *in vitro* study. *Indian J Dent Res* 2008 Jan-Mar; 19(1):29-35.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontol* 2009;44(6): 751-9.

Forabosco A, Galetti R, Spinato S, Colao P, Casolari C. A comparative study of a surgical method and scaling and root planning using the Odontoson. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 611-14.

Franco EB, Bosquioli V, Lopes LG. LED - uma nova tecnologia para fotopolimerização: avaliação com cimento ionomérico modificado por resina. *J Bras Clin Odontol Integr* 2003; 7(38):116-118.

Gebara ECE, Zardetto CGC, Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo*, 1996;10(4) p.251- 6.

Gennaro A. Remington's pharmaceutical sciences. Easton PA: Mack, 1990;1:1169.

Giusti JSM, Pinto LS, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho Filho E, Kurachi C, *et al.* Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed. Laser Sur.* 2008 Aug; 26(4): 281-287.

Gjerme P, Bonesvoll P, Rølla G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol.* 1974;19(11):1031-4.

Goodson JM, Offenbacher S, Farr DH, Hogan PE. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J Periodontol.* 1985 May;56(5):265-72.

Goodson JM. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res* 1989; 68:1625-1632.

Greenstein G. Povidone-Iodine's effects and role in the management of periodontal diseases: A review. *J Periodontol* 1999, 70:1397–1405.

Grenier D. Antagonistic effect of oral bacteria towards *Treponema denticola*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1249–1252.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS, *et al.* Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 1997 Oct.;24(10):767-76.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec.;8(1):115-81.

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

Hannes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: Pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003 Dec;8(1):79-98.

Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. *Pharmazie.* 2009;64(10):666-73.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2002 Feb;29 Suppl 3:136-59.

Higashitsutsumi M, Kamoi K, Miyata H, Ohgi S, Shimizu T, Koide K *et al.* Bactericidal effects of povidone-iodine solution to oral pathogenic bacteria in vitro. *Postgrad Med J* 1993; 69 Suppl 3): S10-4.

Hjeljord LG, Rølla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res* 1973; 8(suppl 12): 11–16.

Hoang T, Jorgensen MG, Keim RG, Pattison AM, Slots J. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodontal Res*. 2003 Jun; 38(3): 311-7.

Hosaka Y, Saito A, Maeda R, Fukaya C, Morikawa S, Makino A, *et al.* Antibacterial activity of povidine-iodine against an artificial biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Arch Oral Biol* 2012; 57:364-368.

Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol*. 1964;16:655-62.

Hugo WB, Longworth AR. The effects of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1966; 18:569-578.

Jenkins S, Addy M, Newcombe R. Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol* 1994; 21:250-255.

Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*. 1975; 10: 332-345.

Jorgensen MG, Alam A, Slots J. Periodontal antimicrobials—finding the right solutions. *Int Dent J*. 2005 Feb.;55(1):3-12.

Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25:505-519.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* 1996 Feb;67(2):93-102.

Karlsson MR, Löfgren CID, Jansson HM. The effect of laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in subjects with chronic periodontitis: a systematic review. *J Periodontol* 2008 Nov; 79:2021-2028.

Karu T. Low-Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook* 2003 Feb; 48-20.



Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsumoto I, Arita M, Yoshihara N, et al. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. *Dermatology* 1997;195 suppl 2:29-35.

Keijser JAM; Verkade H; Timmerman MF; Van der Weijden FA. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrises. *J Periodontol* 2003; 74(2): 214-18.

Killooy WJ. The clinical significance of local chemotherapies. *J Clin Periodontol* 2002 Jan;29(1):22–9.

Kinane DF, Lindhe J. Patogênese da periodontite. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 127-152.

Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000 Nov; 75(5): 676-80.

Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Mar;47(3):932-40.

Kömerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25:487–504

König B, Reimer K, Fleischer W, König W. Effects of Betaisodona® on parameters of host defense. *Dermatol.* 1997; 195 Suppl 2: 42-48.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694-04.

Krück C, Eick S, Knöfler GU, Purschwitz RE, Jentsch FR. Clinical and microbiologic results 12 months after scaling and root planing with different irrigation solutions in patients with moderate chronic periodontitis: a pilot randomized trial. *J Periodontol* 2012;83(3):312-320.

Kunisada T, Yamada K, Oda S, Hara O. Investigation on the efficacy of povidone iodine against antiseptic –resistant species. *Dermatology.* 1997; 195: 14-18.

Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol* 2000 Oct; 1996;12(1):44-8.

Lanker-Klossner B, Widmer HR, Frey F. Non development of resistance by bacteria during hospital use of povidone iodine. *Dermatology*. 1997;195 (suppl2):10-13.

Leonhardt A, Bergstrom C, Krok L, Cardaropoli G. Healing following ultrasonic debridement and PVP-iodine in individuals with severe chronic periodontal disease: a randomized, controlled clinical study. *Acta Odontol Scand*. 2006 Oct.;64(5):262-6.

Levy JG. Photodynamic therapy. *Trends in Biotechnol*. 1995;13:14.

Lima JPM, Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Oliveira CS, Santos MN, *et al*. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* 2009 Oct; 117(5):568–574.

Linder N, Davidovitch N, Reichman B. Topical iodine-containing antiseptics and subclinical hypothyroidism in preterm infants. *J Pediatr*. 1998; 133: 309-19.

Lindhe J, Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol*. 1975; 2:67-79.

Lindhe J, Nyman S, Karring T. Scaling and root planning in shallow pockets. *J Clin Periodontol*. 1984; 9(5): 415-18.

Lindhe J. Tratado de periodontologia clínica. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Literat A, Su F, Norwicki M, Durand M, Ramanathan R, Jones CA, *et al*. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by Curcumin in hyaline membrane disease (HDM). *Life Sci.*, 2001 Dec; 70(3):253-267.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; 36: 177-187.

Löe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):79-83.

Löe H. Does Chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J Periodont Res* 1973;8(Suppl 12):93-99.

Löe H, Schiött CR, Karring G, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontal Res*. 1976;11(3):135-44.

Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. J Clin Periodontol 1986 May;13(5):431-45.

Lopes BMV, Theodoro LH, Melo RF, Thompson GMA, Marcantonio RAC. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontol treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. J Periodontol 2010, 81:682-691.

Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonisation of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. J Clin Periodontol. 1984; 11: 193-207.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? Lasers Med Sci 2007; 22:83-91.

Maruniak J, Clark WB, Walker CB, Magnusson I, Marks RG, Taylor M, Clouser B. The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. J Clin Periodontol, 1992; 19(1): 19-23.

Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. Int J Periodontics Restorative Dent. 1986; 6 (6): 25-35.

Matthijs S, Adriaems PA, Chlorhexidine varnishes: a review. J Clin Periodontol 2002; 29(1):1-8.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B 2005, 79:159-170.

Michel D, Zach GA. Antiseptic efficacy of disinfecting solutions in suspensions test in vitro against antiseptic-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in pressure sore wounds after spinal cord injury. Dermatology. 1997; 195 (suppl 2): 36-41.

Mills RW, Jandt KD, Ashworth SH. Dental composite depth of cure with halogen and blue light emitting diode technology. Br Dent J 1999; 186(8):388-91.

Mombelli A. A utilizacao de antibioticos na terapia periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Clinica e Implantologia Oral. 4° ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005 p. 478-94.

Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistent patens of *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. J Periodontol. 2000 Jan.;71(1):14-21.

Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. Int Dent J. 2004 Feb.;54(1):3-14.

Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MCC, Porto MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. Rev Cien. Med Biol. 2008; 7(3): 266-72.

Muller RF, Hopfner C, Lange DE. Efficacy of a PVP-iodine compound on selected pathogens of the oral cavity in vitro. Dtsch Zahnarztl Z 1989; 5(44): 366-9.

Nakagawa T, Saito A, Hosaka Y, Yamada S, Tsunoda M, Sato T et al. Bactericidal effects on subgingival bacteria of irrigation with a povidone-iodine solution (Neojodin). Bull Tokyo Dent Coll. 1990;31(3):199-203.

Niedner R. Cytotoxicity and sensitization of povidone-iodine and other frequently used anti-infective agents. Dermatology. 1997: 195 (suppl 2); 89-92.

Nobukuni S, Watanabe K, Inaoue J *et al.* Nobukuni K, Hayakawa N, Namba R *et al.* The influence of long-term treatment with povidone-iodine on thyroid function. Dermatology. 1997; 195 Suppl 2: 69-72.

Nyman S, Rosling B, Lindhe J. Effect of professional tooth cleaning on healing after periodontal surgery. J Clin Periodontol 1975: 2; 80-86.

Oda S, Nitta H, Setoguchi T, Izumi Y, Ishikawa I. Current concepts and advances in manual and power-driven instrumentation. Periodontol. 2000 2004 Feb;36(1):45-58.

Oliveira RP, Schwartz-Filho, Novaes Jr AB, Taba Jr M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol 2007;78:965-973.

Oliveira JDC, Pimentel JO, Macedo SRA, Mota OML, Rocha MMNP, Pereira SLS. Efeito do iodo-povidine sobre microrganismos de biofilme subgengival: estudo experimental *in vitro*. Rev Bras Pesq em Saúde 2009;11(3):4-8.

Oosterwaal PHM, Mikx FHM, van der Brink ME, Renggli HH. Bactericidal concentration of chlorhexidine-digluconate, amine-fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. J Periodontol Res. 1989 Mar.;24(2):155-60.

Oosterwaal PJ, Mikx FH, van 't Hof MA, Renggli HH. Short-term bactericidal activity of chlorhexidine gel, stannous fluoride gel and amine fluoride gel tested in periodontal pockets. J Clin Periodontol 1991a; 18: 97–100.

Oosterwaal PJ, Mikx FH, van't Hof MA, Renggli HH. Comparison of the antimicrobial effect of the application of chlorhexidine gel, amine fluoride gel and stannous fluoride gel in debrided periodontal pockets. J Clin Periodontol 1991b; 18: 245–251.

O'Neil JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. Lasers Surg Med. 2002;31:86-90.

Parashis AO, Anagnou-Vareltzides A, Demetriou N. Calculus removal from multirooted teeth with and without surgical access (I). Efficacy on external and furcation surfaces in relation to probing depth. J Clin Periodontol 1993; 20:63-68.

Péret-Almeida L, Naghetini CC, Nunan EA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. Ciênc. Agrotec (2008);32:875-881.

Pires HC. Comparação de dois sistemas de fotoativação de resinas compostas LED e lâmpada halógena: avaliação através de dureza em amostras de resina composta. [Dissertação de mestrado] Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru, 2005.

Pohl-Markl H, Neumann R. Polyvinylpyrrolidon-Jod (PVP-Jod) – seine Bedeutung für die Dermatologie. Z Hautkr. 1988; 63: 1009-1015. Apud Niedner R. Cytotoxicity and sensitization of povidone-iodine and other frequently used anti-infective agents. Dermatol. 1997; 195 Suppl 2: 89-92.

Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. J Clin Periodontol 2009; 36:575-580.

Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. Appl Environ Microbiol. 1998;64(9):3515-9.

Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Photochem Photobiol B, 2007 Jan; 86(1):70–76.

Prates RA, da Silva EG, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica Rev Bras Fis Med 2010; 4(1):53-7.

Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. J Clin Periodontol 2005 Jul; 32(7):714-719.

Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. Lasers Med Sci 2008a Jan; 23(1):49-54.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. J Periodontal Res 2008b Apr; 43(2):162-167.

Quirynen M, Teughel W, De Soete M, Van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. Periodontology 2000 2002 Feb.;28(1):72–90.

Raab O. Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. Z Biol 1900; 39:524-556.

Rabbani GM, Ash MM, Caffesse RG. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. J Periodontol 1981 Mar;52(3):119-23.

Rabe LK, Hillier SL. Effect of chlorhexidine on genital microflora, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* in vitro. Sex Transm Dis 2000; 27: 74–78.

Rahn, Schneider S, Diehl O, Schäfer V, Shah PM. Preventing post-treatment bacteremia: comparing topical povidone-iodine and chlorhexidine. J Am Dent Assoc 1995 Aug;126(8):1145-1149.

Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. J Clin Periodontol, 1987; 14: 445-52.

Ramsewak RS, DeWitt DL, Nair MG. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin I-III from *Curcuma longa*. Phytomedicine, 2000 Jul; 7(4):303-8.

Rateitschak-Plus EM, Schwarz JP, Guggenheim R, Duggelin M, Rateitschak KH. Non-surgical periodontal treatment: Where are the limits? J Clin Periodontol 1992 Apr;19(4):240-4.

Redmond RW, Kochevar I. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. Photochem Photobiol 2006; 82:1178-1186.

Ribeiro MS, Groth EB, Yamada Am, Garcez AS, Suzuki LC, Prates RA, Nunez SC. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. 23º CIOSP, São Paulo, 2005.

Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2013 Feb;28(2):391-398.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999; 27:887–892.

Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol* 2000 2002 Jan;28(1):280–97.

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975; 54(spec issue B): 57–62.

Rosling BG, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol*, 1976a; 3: 38-53.

Rovaldi CR, Pievsky A, Sole AN, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against Oral Pathogens *In Vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 14(12):3364-67.

Rusig O, Martins MC. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. *Rev Bras Coran Nat*, 1992; 1(1):158-164.

Rosling BG, Slots J, Christersson LA, Grondahl HG, Genco RJ. Topical antimicrobial therapy and diagnosis of subgingival bacteria in the management of inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1986; 10(13): 975-81.

Rosling B, Hellstrom MK, Ramberg F, Socransky SS, Lindhe J. The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Nov.;28(11):1023–31.

Rushton A. Safety of Hibitane. II. Human experience. *J Clin Periodontol*. 1977;4(5):73-9.

Samaranayake LP , MacFarlane TW . *Oral Candidosis*. London, UK:Wright-Butterworth , 1990 .

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque samples from patients with chronic periodontitis. J Periodont Res 1993; 28:204–210

Schaeken MJ, de Jong MH, Franken HC, van der Hoeven JS. Effect of chlorhexidine and iodine on the composition of the human dental plaque flora. Caries Res 1984; 5(18): 401-7.

Schiott C, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. J Periodontol Res 1970; 5: 84-89.

Schiott CR, Briner Ww, Loe H. Two years oral use of chlorhexidine in man. II. The effect on the salivary bacterial flora. J. Periodontal Res 1976 Jun; 11(3):145-152.

Schlagenhauf U, Stellwag P, Fiedler A. Subgingival irrigation in the maintenance phase of periodontal therapy. J. Clin. Periodontol. 1990; 17(9): 650-653.

Schreier H, Erdos G, Reimer K, Konig B, Konig W, Fleischer W. Molecular effects of povidone-iodine on relevant microorganisms: an electron-microscopic and biochemical study. Dermatology 1997;195 Suppl. 2:111-6.

Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB, De La Rosa M, Isaacs RL, Lang NP, *et al.* A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. J Periodontol Res. 1986;21 Suppl 16:23-32.

Sekino S, Ramberg P, Guzin Uzel L, Socransky S, Lindhe J. The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. J Clin Periodontol 2004;31:609-614.

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. J Clin Periodontol 2001 Oct;28(10):910-6.

Sherman PR, Hutchens LH, Jawson LG, Moriarty JM, Greco GW, McFall WT. The effectiveness of subgingival scaling and root planning I. Clinical detection of residual calculus. J Periodontol 1990, 61:3-8.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. J Periodontol 2005 Jul;76(7):1100-5.



Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Nova terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. 2002;25(5):801-07.

Sinnes EP. Controle químico da placa bacteriana. In: Lascala NT. Prevenção na Clínica Odontológica: promoção da saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas, 1997, 174-185.

Slots J, Rams TE, Schonfeld SE. *In vitro* activity of chlorhexidine against enteric rods, pseudomonads and acinetobacter from human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1991; 6: 62–64.

Slots J. Selection of antimicrobial agent in periodontal therapy. J Periodont Res. 2002 Oct.;37(5):389-98.

Smulow JB, Turesky SS, Hill RG. The effect of supragingival plaque removal on anaerobic bacteria deep periodontal pockets. J Am Dent Assoc. 1983 Nov; 107(5): 737-42.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998 Feb;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002; 28:12-55.

Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated in vitro. Lasers Surg Med. 1996;18:253-259.

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Douks AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in oral biofilm model. Lasers Surg. Med. 2003 Sept;33(3):161-168.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontology 2000 2011; 55:143-166.

Sousa GR. Análise comparativa da emissão de luz por led e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo “in vitro”: [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais; 2007

Spijkervet FK, van Saene JJ, van Saene HK, Panders AK, Vermey A, Filder V. Chlorhexidine inactivation by saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1990;69: 444–449.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001; 4(34): 300-7.

Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjö UME. Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after *in situ* subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. J Periodontol 1993; 64: 137–141.

Stambaugh RV, Dragoo M, Smith DM, Carasali L. The limits of subgingival scaling. Int J Periodontics Restorative Dent 1981 Jan;1(1):30-41.

Svardstrom G, Wennstrom JL. Periodontal treatment decisions for molars: an analysis of influencing factors and long-term outcome. J Periodontol 2000 Apr;71(4):579-85.

Takasaki AA; Aoki A; Mizutani K; Schwarz AS; Wang C; Koshy G; *et al.* Application of antimicrobial therapy in periodontal and peri-implant diseases . Periodontol 2000 2009; 51:1-32.

Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. Mar Drugs 2010 Jan; 8(1):91-105.

Torezan LAR. Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica com ácido 5-delta aminolevulínico (ALA) tópico no carcinoma basocelular. 2000. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2000.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. In: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.181-206.

Tseng PW, Newcomb GM. The effect of a single episode of chlorhexidine irrigation on the gingival response to scaling and root planing. J Clin Dent 1991; 2: 83–86.

Usacheva AMN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg. Med., 2001 Aug; 29(2):165-173.

Ushoa AF, Baptista MS. Terapia fotodinâmica: mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. J Bras. de Laser 2007 Out; 1(4):10-22.

Van der Meulen FW, Ibrahim K, Sterenberg HJCM, Alphen VL, Maikoe A, Dankert J. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B40, 204, 1997.

Van Steenberghe D, Rosling B, Soder PO, Landry RG, van der Velden U et al. A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis. J Periodontol. 1999; 70: 657-67.

Van Strydonck DA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. J Clin Periodontol 2005; 32(3):305-309.

Veronica W-K, Bissada NF. Clinical evaluation of systemic doxycycline and ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis. J Periodontol. 1998; 69: 772-76.

Von Ohle C, Weiger R, Decker E, Schlagenhauf U, Brex M. The effect of a single pocket irrigation on subgingival microbial vitality. Clin Oral Invest. 1998 Aug.;2(2):84-90.

Von Trappeiner H, Jesionek A. Therapeutische versuche mit Fluoreszierenden Stoffen. Much Med Wochenschr 1903; 47:2042-2044.

Wade WG, Addy M. *In vitro* activity of a chlorhexidine containing mouthwash against subgingival bacteria. J Periodontol 1989; 60: 521–525.

Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II. As observed on extracted teeth. J Periodontol. 1978; 49 (3): 119-134.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother 1998; 42(1):13-28.

Wainwright M. Pathogen Inactivation in Blood Products. Curr Med Chem 2002 Jan; 9(1):127-43.

Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents – circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. Int Biodeterior Biodegrad 2004, 53:119-26.

Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. Periodontol. 2000 1996 Feb.;10:79–88.

Weinstein GD, McCulloch, Nelson JS, Berns MW. Low dose Photofrin II photodynamic therapy of psoriasis. J Invest Dermatol. 1991;96:573.

Wennstrom JL, Dahlen G, Grondahl K, Heijl L. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets. II. Microbiological and radiographical observations. J Clin Periodontol 1987; 10(14): 573-80.

Weennström JL. Rinsing, irrigation and sustained local delivery. *In*: Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology, Quintessence books 1997; 131.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue o in a collagen matrix and carious dentine. Caries Res. Basel, 2004 Nov/Dec; 38(6):530-536.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser radiation. Curr. Microbiol. 1992;25:77-81.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. J Applied Bacteriol 1993; 75:299-306.

Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitisation of *Candida albicans in vitro*. Lasers Med Sci 1994; 9:105-109.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. J Appl Bacteriol 1995;78:569-574.

Wilson M. Lethal photossensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sci 2004, 3;412-418.

Winrow MJ. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. J Periodontal Res Suppl. 1973;12:45-8.

Wolf LF, Bakdash MB, Pilhlstrom BL, Bandt CL, Aeppli DM. The effect of professional and home subgingival irrigation with antimicrobial agents on gingivitis and early periodontitis. J Dent Hyg 1989; 5(63): 222-5, 41.

Wolf P, Finkk-Puches R, Cerroni L, Kerl H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides. J Am Acad Derm 1994;31:678.

Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, brookes S, Griffiths J, *et al.* An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1999;50:1-7.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompsom M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J CLin Periodontol* 2000 Sep; 27(9):637-47.

Yamada JrAM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO* 2004, 52(3):207-210.

Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaque covered surfaces. A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2007;78(11):2127-2134.

Zanatta FB, Rösing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A* 2007; 1(2): 35-43.

Zanatta FB, Kuchenbecker C. Chlorhexidine: action's mechanisms and recent evidences of its efficacy over supragingival biofilm context. *Scientific-A* 2007;1(2):35-43.

Zanin ICJ, Gonçalves RB. Novas perspectivas do uso do laser terapêutico. In: Brugnera Júnior A; Sanros AEC, Bologna ED, Ladalardo TCCG. *Laserterapia aplicada à clínica odontológica.* São Paulo:Santos, 2003; 99-102.

Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, HopeCK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005 Aug; 56(2):324–330.

Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64-9.

Zaura-Arite E, van Marle J, Ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001;80(5):1.



## ANEXO 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa



### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

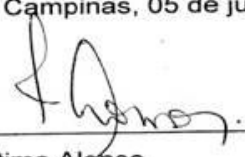
#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação periodontal do efeito da terapia fotodinâmica em animais" (protocolo nº 2727-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum / Mirella Lindoso Gomes Campos, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de junho de 2012.

Campinas, 05 de junho de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>