



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

VIVIENE SANTANA BARBOSA

**Efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica
como coadjuvante ao tratamento periodontal
não cirúrgico e suas implicações nos tecidos
periodontais: análise microbiológica e
morfométrica em ratos**

Piracicaba
2017

VIVIENE SANTANA BARBOSA

**Efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica
como coadjuvante ao tratamento periodontal
não cirúrgico e suas implicações nos tecidos
periodontais: análise microbiológica e
morfométrica em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Clínica Odontológica, Área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA VIVIENE SANTANA
BARBOSA, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. ANTONIO WILSON SALLUM.

Piracicaba
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B234e Barbosa, Vivieni Santana, 1982-
Efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico e suas implicações nos tecidos periodontais : análise microbiológica e morfométrica em ratos / Vivieni Santana Barbosa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Antonio Wilson Sallum.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of curcumin on photodynamic therapy as a adjuvant to non-surgical periodontal treatment and its implications on periodontal tissues : microbiological and morphometric analysis in rats

Palavras-chave em inglês:

Photochemotherapy

Curcumin

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Antonio Wilson Sallum [Orientador]

Mirella Lindoso Gomes Campos

Mônica Grazieli Corrêa

Samira Salmeron

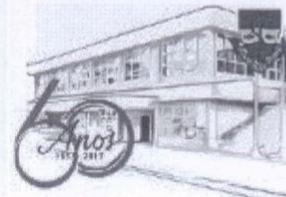
Renato Corrêa Viana Casarin

Data de defesa: 17-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata VIVIENE SANTANA BARBOSA aprovada.

PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM

PROF^a. DR^a. MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS

PROF^a. DR^a. MÔNICA GRAZIELI CORRÊA

PROF^a. DR^a. SAMIRA SALMERON

PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais, Milton Barbosa e Lidineia Barbosa, 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. A meu noivo, Ricardo Vinturi, por estar sempre ao meu lado me apoiando e dividindo comigo todas as emoções dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo amor e misericórdia dispensados a mim diariamente. Pela oportunidade de viver esse momento e por cuidar de mim nos mínimos detalhes. A Ele toda honra e glória.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

À Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, presidente da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e à Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, coordenadora do programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, pela grande oportunidade de ser sua orientada. Sinto-me honrada e privilegiada!!! Obrigada pelo senhor me ensinar que para se ter sucesso na vida é preciso ter paixão pelo que faz. Muito obrigada pelos ensinamentos diários, 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, Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz e Prof. Dr. Ranato Corrêa Viana Casarin, pelos ensinamentos e por contribuírem de forma fundamental na minha carreira profissional.

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

À Eliete Marim, secretária da Prótese, por sempre nos receber com um sorriso no rosto e nos ajudar no momento que precisamos.

À Mariana Fergolin pela paciência em me ensinar o manejo dos materiais no laboratório e pela dedicação em sempre manter a organização do laboratório tornando as atividades muito mais prazerosas.

À minha banca de qualificação: Profa. Dra. Denise Carleto Andia, Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp e Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin por contribuírem de forma essencial para o aprimoramento desse trabalho.

Aos bioteristas da FOP-Unicamp Wanderley Vieira e Rafael Soares de Sousa, pelo cuidado dispensado aos animais.

Aos meus colegas de Pós-graduação: Ana Regina Moreira, Camila Camarinha, João Paulo Sangiorgio, Mayra Albiero, Mércia Cunha, Miki Saito, Thiago Taiete, Thiago Tarbes, Ana Livia Fileto, Marcela Di Moura, Guilherme Oliveira, Isabela França, Mabelle Freitas, Manuela Rocha, Fernanda Félix, Thiago Bueno, Amanda Bandeira, Rahyza Freire, Rafaela Videira e Elis Lira, pelo companherismo e ajuda nos momentos difíceis dessa jornada. Com certeza passar por tudo isso com vocês foi muito mais fácil.

Mércia Cunha, 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 Profa. Dra. Samira Salmeron, minha amiga, que foi chegando de mansinho e conquistando nossos corações da forma mais doce. Muito feliz por você fazer parte desse momento comigo, como minha banca!! Muito obrigada pelos conselhos, pela amizade e por poder sempre contar contigo nos momentos que precisei.

À Guilherme Oliveira, por todos os momentos que vivemos esses anos. Muito obrigada pela sua amizade!!

À Profa. Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos, a quem devo muito pelos ensinamentos adquiridos na pós-graduação, com quem aprendi tudo sobre o manejo com os animais no biotério. 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 pelo carinho e pela amizade.

À Profa. Dra. Mônica Grazieli Côrrea, que embora os momentos juntas tenham sido poucos, foram momentos especiais. Muito obrigada por fazer parte desse momento especial.

Ao Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, pelos ensinamentos, carinho, pela paciência e pelo auxílio nas análises estatísticas da pesquisa. Muito obrigada, por fazer parte da minha banca e contribuir de forma fundamental no trabalho.

Ao Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp, que com muita paciência me mostrou as maravilhas da microbiologia. Muito obrigada pela atenção dispensada e pelos ensinamentos. Com toda certeza, você foi peça fundamental para realização e concretização desse trabalho.

À D. Sônia Romani e família, que de forma muito especial me acolheram em Piracicaba e me fizeram sentir como parte da família. Muito obrigada pelo carinho, amizade e pelos cuidados. Só Deus para recompensá-los por tudo que vocês fazem por mim.

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. Te amo!! 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. À Elias, meu cunhado, por sempre ter uma palavra de incentivo e de conforto. Ao meu sobrinho, Miguel Rosas, um anjinho que Deus nos presenteou e só nos traz alegrias.

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

“Determinação, coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

RESUMO

A curcumina é um corante natural que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas que podem ser exacerbadas quando associada a uma fonte de luz. Devido a falta de um protocolo ideal para uso da terapia fotodinâmica na Periodontia, o presente estudo teve como objetivo avaliar morfometricamente e microbiologicamente a ação da curcumina como fotosensibilizador na terapia fotodinâmica antimicrobiana, como coadjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico, e suas implicações nos tecidos periodontais de ratos acometidos por doença periodontal experimental. Para isso, 30 ratos Wistar receberam inserção de ligadura em um dos primeiros molares inferiores e outros 4 animais não receberam nem ligadura e nenhum tipo de tratamento, totalizando 34 animais no experimento. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo doença periodontal (n = 8); grupo raspagem e alisamento radicular (RAR) (n = 8); grupo RAR + terapia fotodinâmica (RAR + TFD) (n = 8) e grupo curcumina (n = 6). A doença foi induzida por 7 dias e após esse período cada grupo recebeu o respectivo tratamento. Sete dias após a aplicação das terapias os animais foram submetidos à eutanásia. Morfometricamente, entre os dentes do grupo doença periodontal e os tratados, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$). Contudo, não foram verificadas diferenças no padrão de reparo entre os grupos de tratamento ($p > 0,05$). Na avaliação microbiológica, houve uma redução significativa na contagem bacteriana nos molares tratados com TFD quando comparados com o grupo curcumina ($p < 0,001$) e o grupo doença periodontal ($p < 0,01$). No entanto, dentre os molares tratados com a curcumina, não houve uma redução efetiva ($p > 0,05$) da contagem bacteriana quando comparados ao grupo doença periodontal. Sendo assim, pode-se concluir que quando associada a uma fonte de luz, a curcumina apresentou uma boa efetividade antibacteriana sobre os microrganismos totais. Contudo, embora a sua utilização isolada ou quando associada à uma fonte de luz como coadjuvante à RAR tenha mostrado um reparo no tecido ósseo, não mostrou resultados superiores quando comparados com a RAR apenas.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, curcumina, raspagem e alisamento radicular

ABSTRACT

Curcumin is a natural dye, which exhibits anti-inflammatory, antimicrobial, and antifungal properties that can be exacerbated when associated with a light source. Due to the lack of an ideal protocol for photodynamic therapy use in periodontics, the present study aimed to evaluate, morphometrically and microbiologically, the action of curcumin as a photosensitizer in photodynamic therapy, as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment, and its implications in rats periodontal tissues affected by experimental periodontal disease. For this, thirty Wistar rats received ligature insertion in one of the first lower molars, and another four animals received neither ligation nor any type of treatment, totalizing 34 animals on the experiment. The animals were divided into the following groups: periodontal disease group (n = 8); scaling and root planning group (SRP) (n = 8); SRP + photodynamic therapy group (SRP + PDT) (n = 8); and curcumin group (n = 6). Disease was induced for 7 days and, after that period, each group received the respective treatment. Animals were submitted to euthanasia after the application of therapies. Morphometrically, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between teeth of periodontal disease group and the treated ones. However, there were no differences in repair pattern among treatment groups ($p > 0.05$). Microbiological evaluation showed a significant reduction in bacterial count in molars treated with PDT when compared to teeth that received treatment with curcumin alone ($p < 0.001$) and teeth which only periodontal disease was induced ($p < 0.01$). Nevertheless, among molars treated with curcumin there was no effective reduction ($p > 0.05$) of bacterial count when compared to periodontal disease group. Thus, it can be concluded that when associated with a light source, curcumin showed a good antibacterial effectiveness over total microorganisms. However, although curcumin's use, alone or associated with a light source as an adjunct to SRP, has shown bone tissue repair, it did not demonstrate superior results when compared to SRP alone.

Keywords: photodynamic therapy, curcumin, scaling and root planing

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

An - *Actinomyces naeslundii*

CN – controle negativo

DP – doença periodontal

Fn – *Fusobacterium nucleatum*

IFN- γ – interferon- γ

IL - interleucinas

IP – Índice de placa

LED – Light Emitting Diodes

LPS - lipopolissacarídeos

μ l – Microlitro

μ m – Micrômetro

μ M – micromolar

nm - nanômetro

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto

λ – Comprimento de onda

Mmol/L – milimolar por litro

NIC – Nível de inserção clínica

Pi – *Prevotella intermedia*

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

PS – Profundidade de sondagem

RAR – Raspagem e alisamento radicular

RTF – Meio de transporte fluido reduzido

SS – Sangramento à sondagem

TBO – azul de toluidina O

Td – *Treponema denticola*

Tf – *Tannerella forsythia*

TFD – Terapia fotodinâmica

TNF – fator de necrose tumoral

UFC – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Tratamento periodontal não cirúrgico	18
2.2 Terapia Fotodinâmica	20
2.2.1 Histórico	20
2.2.2 Mecanismo de ação da TFD	21
2.2.3 Fontes de luz	23
2.2.4 Fotosensibilizador	24
2.2.5 Terapia fotodinâmica na Periodontia	25
2.2.6 Uso da curcumina como Fotossensibilizador	33
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Fase experimental in vitro	44
4.2 Fase experimental in vivo	45
4.2.1 Animais	45
4.2.2 Delineamento do estudo	46
4.2.3 Indução da periodontite experimental	46
4.2.4 Divisão dos grupos e aplicação das terapias	47
4.2.5 Eutanásia dos animais	49
4.3 Preparo das mandíbulas para análise morfométrica	49
4.4 Avaliação morfométrica	49
4.5 Calibração da Examinadora	50
4.6 Cultura dos micro-organismos totais	50
4.7 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	52

5.1. Concentração e tempo de fotoativação do corante	52
5.2 Avaliação morfológica e microbiológica	53
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	76

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma condição 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 e em última instância na perda dentária (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 patogênicos subgingivais 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).

Entretanto, bolsas residuais são frequentemente observadas após o tratamento da RAR. Isso pode ser explicado pelo fato de que os microrganismos periodontopatogênicos têm a capacidade de invadir os tecidos periodontais ou túbulos dentinários, tornando-se inacessíveis ou porque eles se encontram em locais inalcançáveis aos instrumentos periodontais. Esse pode ser o caso de bolsas periodontais profundas, concavidades na superfície radicular ou áreas de furca (Addy, 1999; 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).

Diante disso, esses achados têm suportado o uso de diferentes terapias coadjuvantes ao tratamento da RAR, como o uso de antibióticos sistêmicos ou locais, no intuito de promover a redução dos patógenos periodontais e dessa forma trazer benefícios adicionais à terapia convencional (Quirynen *et al.*, 2002; Slots, 2002; 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, muitas vezes a concentração do antibiótico encontra-se abaixo da concentração mínima para sua ação bactericida (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). Todos esses fatores associadas aos antibióticos tem tornado o seu uso restrito dentro da Periodontia (Meisel & Kocher, 2005).

Nesse contexto, no intuito de driblar as limitações do uso dos antimicrobianos, novas abordagens de tratamento visando a redução bacteriana, tais como a terapia fotodinâmica (TFD), tem sido proposta como uma alternativa mais efetiva 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 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 de 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).

Contudo, ainda não existe um consenso na utilização dos agentes fotoativos para TFD na descontaminação bucal. Diante disso, novas gerações de corantes têm sido estudadas, no intuito de buscar novos compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes (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).

Devido às suas propriedades terapêuticas, a curcumina, vem sendo estudada e proposta como possível agente fotossensibilizador na TFD. A curcumina em seu estado natural possui ação antimicrobiana somente em grandes concentrações, porém uma vez ativada por uma fonte de luz, desenvolve potente efeito fototóxico em concentrações micromolares (Dahl *et al.*, 1989). Além disso, autores têm proposto que a curcumina auxilia a

imunomodulação da resposta inflamatória do hospedeiro, podendo atuar tanto na resposta celular quanto humoral do mesmo, auxiliando o processo cicatricial (Jagetia & Aggarwal, 2007).

Sendo assim, diante dos benefícios observados com a curcumina e devido a falta de um protocolo padrão-ouro para uso da TFD na Periodontia, o objetivo deste trabalho foi testar um protocolo utilizando a curcumina como fotosensibilizador na TFD e avaliar, através de um estudo microbiológico e morfométrico seu efeito como coadjuvante à RAR e suas implicações nos tecidos periodontais acometidos por doença periodontal experimental induzida em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tratamento periodontal não cirúrgico

Já está bem documentado na literatura que existem por volta de 1000 espécies bacterianas já isoladas e identificadas na cavidade bucal (Wilson, 2004). 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 bacterianas na placa supra e subgingival de 25 indivíduos com periodonto sadio e em 160 indivíduos com periodontite crônica através da técnica hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Os autores concluíram que nos sítios doentes houve maior proporção de bactérias do chamado complexo vermelho, composto pela *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*) e *Tannarella forsythia* (*Tf*) e que quanto maior a severidade da doença, ou seja, quanto maior a profundidade da bolsa, maior a prevalência dessas espécies microbianas.

Alguns estudos têm mostrado a efetividade da terapia periodontal inicial na resolução dos sinais clínicos da doença periodontal (Lindhe *et al.*, 1984; Kaldahl *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2008). Essa terapia consiste em instrução de higiene bucal completa, debridamento supra e subgingival e RAR (Kocher *et al.*, 2001). Após a realização destes procedimentos, são observados uma redução da inflamação clínica, mudança de uma microbiota mais patogênica para uma microbiota mais compatível com saúde periodontal, redução na profundidade de sondagem e ganho no nível de inserção clínica (Lindhe *et al.*, 1984; Ramfjord *et al.*, 1987; Kaldahl *et al.*, 1996).

Muitos estudos têm demonstrado a importância clínica do controle regular do biofilme supragengival (Löe *et al.*, 1965; Nyman *et al.*, 1975; Lindhe & Nyman, 1975; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000). 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 microrganismos, quando realizada profilaxia diária dos depósitos supragengivais. Magnusson *et al.* (1984) relataram que um controle meticuloso 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.

Haffajee *et al.* (1997a) examinaram os níveis de 40 espécies bacterianas incluindo *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Pg*, *Prevotella intermedia* (*Pi*) e *Td* usando a hibridização DNA–DNA *checkerboard* antes e após a raspagem e alisamento radicular em 57 indivíduos adultos com periodontite. Após o procedimento da raspagem, foram observados uma média de ganho no nível de inserção e uma redução na vermelhidão gengival, sangramento a sondagem e média de profundidade de sondagem. A prevalência média nos níveis de *Pg*, *Td* e *Tf* foram significativamente reduzidos.

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*, *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Pi* e principalmente bactérias pertencentes ao complexo vermelho como *Pg*, *Tf* e *Td*, mesmo após o tratamento mecânico, tem sido descrita na literatura como um dos pontos de insucesso da terapia periodontal (Haffajee *et al.*, 1997b; Chaves *et al.*, 2000; Mombelli *et al.*, 2000).

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 (Lindhe *et al.*, 1999).

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). 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).

Em um estudo longitudinal com um período de observação de 52 semanas, Loos *et al.* (1988) investigaram os efeitos clínicos e microbiológicos do controle de placa e debridamento radicular em dentes com comprometimento de furca grau II. Eles relataram que os sítios com perda de inserção exibiram maiores contagens microbiana e maiores proporções de espiroquetas, unidades formadoras de colônias produtoras de pigmentos negros e *Pg* do que nos sítios com ganho de inserção.

Diante disso, esses achados têm suportado o uso de novas abordagens terapêuticas, como a terapia fotodinâmica (TFD), como adjuntos ao tratamento mecânico, com o objetivo de melhorar os resultados clínicos e microbiológicos e dessa forma trazer benefícios adicionais à terapia convencional (Quirynen *et al.*, 2002; Slots, 2002).

2.2 Terapia Fotodinâmica

2.2.1 Histórico

A TFD começou a ter relevância científica a partir do século XX. Em 1900, Oscar Raab e Von Tappeiner, constataram acidentalmente, durante um estudo da ação da acridina sobre culturas de paramécios, que estes microrganismos unicelulares, após expostos a uma luz intensa, morriam sob essas condições (Soukos & Godson, 2011). 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 (Soukos & Godson, 2011).

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; Ackroyd *et al.*, 2001).

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 subgingivais (Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

A TFD é hoje aceita no meio científico como modalidade terapêutica para tratamento de inúmeras patologias e dependendo do tipo da célula-alvo, sua aplicação pode ter ação em células-alvo do hospedeiro, como vários tipos de cânceres (Hsi *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2012; Nanashima *et al.*, 2012), acne (Hong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012), psoríase (Salah *et al.*, 2009; Fernández-Guarino *et al.*, 2009), queratose actínica (Tschen *et al.*, 2006) e ação em células-alvo de microrganismos responsáveis por infecções diversas (Hamblin *et al.*, 2002; 2003).

Devido à promissora ação antimicrobiana da TFD, a técnica tem sido proposta em Odontologia como alternativa ao uso de antimicrobianos sistêmicos tradicionalmente utilizados no controle de infecções orais (Wilson *et al.*, 1995; Chabrier-Roselló *et al.*, 2005).

2.2.2 Mecanismo de ação da TFD

A TFD é baseada no princípio de 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 singlete 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; Kikichi *et al.*, 2015).

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

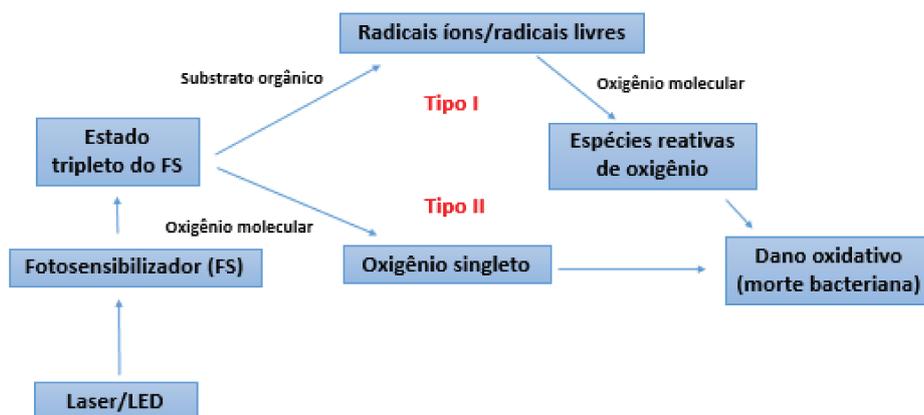
Após irradiação com uma luz de comprimento de onda específico, ressonante ao corante, o agente fotossensibilizador absorve os fótons da fonte de luz, e suas moléculas sofrem uma transição, saem do seu estado fundamental e passam a um estado singlete excitado de energia. Em seguida, estas moléculas podem 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).

Na reação Tipo I, o fotosensibilizador reage diretamente com o substrato, que pode ser a membrana celular ou uma molécula, para formar radicais livres. Estes radicais irão posteriormente reagir com o oxigênio, produzindo as espécies reativas do oxigênio como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido, que provocam a destruição da membrana celular de macromoléculas (Bhatti *et al.*, 1997). Na reação tipo II, o fotossensibilizador transfere sua energia diretamente para o oxigênio molecular, para formar o oxigênio singleto. A vida útil do oxigênio singleto em sistemas biológicos é menor e estruturas que estiverem próximas da sua área de produção são diretamente afetadas. Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do fotossensibilizante, dos substratos intracelulares e da concentração de oxigênio no meio (Fernandes *et al.*, 2009) (Figura 1).

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 (Bhatti *et al.*, 1997). O oxigênio singleto é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação celular (Meisel & Kocher, 2005; Takasaki *et al.*, 2009).

Figura 1 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica. Adaptado de Kikuchi *et al.*, 2015



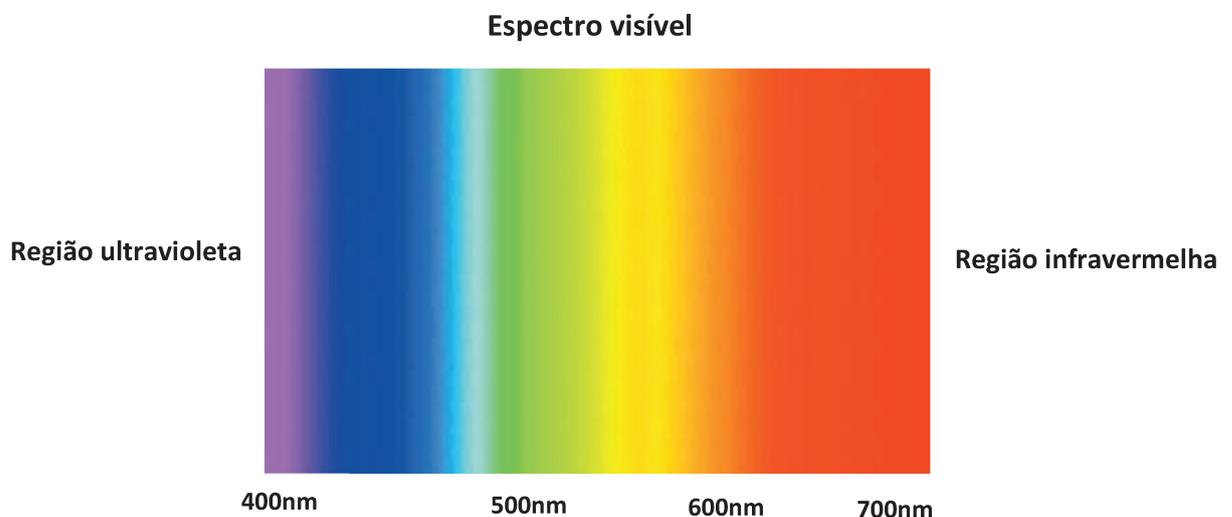
2.2.3 Fontes de luz

A grande maioria dos estudos utilizando a terapia fotodinâmica para obtenção de efeito antimicrobiano utiliza *lasers* de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como luzes alternativas a essa terapia. 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 e quando comparados aos sistemas de *lasers* disponíveis, apresentam vantagens como menor custo, melhor custo-benefício e ainda possuem um tempo de vida maior (Dobson & Wilson, 1992; Meisel & Kocher, 2005; Giusti *et al.*, 2008; Raghavendra *et al.*, 2009). Por esses motivos, essa técnica tornou-se mais atraente, permitindo sua maior implementação (Ribeiro *et al.*, 2005).

A luz é medida em comprimentos de onda e expressa em unidades de nanômetros (nm). Comprimentos de ondas são freqüentemente designados de acordo com sua cor associada e incluem violeta (380-450nm), azul (450-495nm), verde (495-570nm), amarelo (570-590nm), laranja (590-620nm), vermelho (620-750 nm) e infravermelho (acima de 750nm) (Wilson, 1993) (Figura 2).

Figura 2 - Visualização do espectro eletromagnético. Adaptado de Soukos & Godson, 2011.



Para que a luz exerça algum efeito sobre as células bacterianas, primeiramente ela deve ser absorvida por um ou mais constituintes do microrganismo. 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. 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 principais parâmetros da luz envolvidos na terapia fotodinâmica são: energia, que representa a quantidade de luz que está sendo depositada no tecido; potência, que é a 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; dosimetria e densidade de energia, que é a taxa de energia que está sendo aplicada no tecido e comprimento de onda, que define a profundidade de penetração no tecido (Meisel & Kocher, 2005). Em geral, quanto maior o comprimento de onda mais profunda é a penetração tecidual (Barolet, 2008).

2.2.4 Fotosensibilizador

A maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, e por isso a utilização de um fotosensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante (Wilson *et al.*, 1992). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno, azul de toluidina, eosina e hematoporfirinas (Wilson, 1993). No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizado e não devem apresentar danos tóxicos ao hospedeiro (Wilson *et al.*, 1992).

Para Yamada *et al.*, (2004) um agente fotosensibilizador ideal deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente e não tóxico aos tecidos normais do hospedeiro. A penetração do fotossensibilizador através do epitélio e do tecido conjuntivo pode ser importante uma vez que periodontopatógenos também podem se infiltrar através da barreira epitelial para dentro dos tecidos periodontais. Essa observação seria uma possível explicação para a efetividade da TFD (Sigush *et al.*, 2005).

Outros requisitos são importantes para o FS ser considerado ideal: 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).

A sensibilidade bacteriana à luz parece estar relacionada com o tipo do fotossensibilizador. 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 facilita a entrada do FS nessas células, já a membrana externa das gram-negativas atua como uma barreira física entre a célula e o ambiente. Para essas, as drogas devem ser catiônicas ou então 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 se una 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).

2.2.5 Terapia fotodinâmica na Periodontia

Desde o início da década de 1990, a fototerapia tem sido considerada como uma abordagem de tratamento em Periodontia (Takasaki *et al.*, 2009). Os primeiros trabalhos utilizando a terapia fotodinâmica sobre bactérias orais foram realizados por Wilson *et al.* em 1992. O maior interesse dos autores era descobrir compostos químicos que pudessem ser efetivamente utilizados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica. Nesse estudo foram testados 27 compostos e 16 deles tinham capacidade de reduzir *S. sanguinis* quando associados a um laser HeNe. Os mais efetivos foram o azul de ortotoluidina (TBO), azul de

metileno, alumínio dissulfonado fitalocianino, o cristal de violeta e a di-hematoporfirina éster. Neste mesmo estudo, TBO e azul de metileno mostraram-se eficazes na redução de *Pg*, *Fn* e *Aa in vitro*. Em todos os casos, o uso do corante na ausência da luz laser não apresentou efeito significativo sobre a viabilidade dos microrganismos testados.

Komerik *et al.* (2000) avaliaram a capacidade da TFD em afetar a potência de dois fatores de virulência de bactérias gram-negativas: o lipopolissacarídeo (LPS) e proteases. O laser vermelho He-Ne de 632,8 nm (35mW) juntamente com o TBO foram utilizados neste estudo. Os resultados demonstraram que a combinação de TFD + TBO foi capaz de reduzir significativamente a capacidade de LPS a estimular a liberação de citocinas pró inflamatórias. Eles concluíram que TFD + TBO reduziu o excesso de produção de citocinas diminuindo seus efeitos patológicos.

Como mencionado anteriormente, bactérias gram-negativas são em grande parte resistentes a muitos fotossensibilizadores utilizados na TFD. Contudo, algumas espécies microbianas, tais como as bactérias pigmentadas de negro, contêm fotossensibilizadores naturais e são susceptíveis à TFD (Malik *et al.*, 1992). Em um estudo realizado por Soukos *et al.* (2005), os autores hipotetizaram que a morte de bactérias pigmentadas de negro é resultado da excitação da luz sobre suas porfirinas endógenas. Foi demonstrado que a faixa de luz de 380 a 520 nm induz uma redução de três vezes no crescimento de *Pg*, *Pi*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella melaninogenica* em amostras de biofilme dental obtidos de indivíduos com periodontite crônica, sugerindo que a exposição à luz intraoral pode ser usada para controlar o crescimento de bactérias pigmentadas de negro e possivelmente trazer benefícios aos pacientes com doença periodontal. Com base nesses achados, o mesmo grupo propôs uma estratégia fototerapêutica pela qual a exposição diária à luz suprimiria gradualmente o número de bactérias pigmentadas de preto, levando a uma mudança do ambiente microbiano para um ambiente saudável.

Em um estudo *in vitro*, utilizando a terapia fotodinâmica para inativação de bactérias periodontopatogênicas, Sousa (2007) comparou a sensibilização das bactérias periodontopatogênicas (*Fn*, *Aa* e *Pi*), através da utilização de lasers (660 nm) e LED (emitindo entre 620 e 630nm), utilizando como fotossensibilizador azul de toluidina O a 0,01%. Os resultados demonstraram uma redução 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 potencial para a utilização em terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao *Aa* e *Fn*. 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.

Ferreira (2001) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana do *Laser*, de compostos fotossensibilizadores e da associação de ambos sobre *Actinomyces naeslundii*, *Treponema denticola*, *Eubacterium sp*, bastonetes gram negativos capnofílicos e *Streptococcus sanguinis*. Estes microrganismos após cultura foram irrigados com solução de TBO e azul de metileno com concentrações final de 50 µg/mL, com aplicação ou não do *Laser* de diodo semiconductor por 60 e 120 segundos, depositando uma densidade de energia de 150 J/cm² e 300 J/cm². Após tratamento, frações de 100µl foram coletadas e mantidas em cultura de anaerobiose. A contagem das colônias possibilitou concluir que o uso isolado do *Laser* em baixa intensidade e de fotossensibilizadores, não promoveram alterações significativas na viabilidade de microrganismos bucais. Diferenças estatísticas foram evidentes quando se utilizou a associação do *Laser* com o fotossensibilizador, com efeitos maiores nas amostras tratadas com TBO, quando comparada com o azul de metileno não importando o tempo de exposição ao *Laser*.

Muitos autores têm relatado a ação antimicrobiana da TFD sobre bactérias crescidas em caldo de cultivo (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; Soukos *et al.*, 2003, Fontana *et al.*, 2009). Os estudos têm demonstrado que o crescimento de microrganismos bucais em biofilme dificulta a eficácia da técnica, pois isso 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).

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 (25µg/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 (25µg/mL), sob as mesmas condições de luz utilizadas no experimento com microrganismos planctônicos. A TFD eliminou aproximadamente 63% das bactérias presentes na suspensão, enquanto que em biofilme a terapia teve um efeito menor na viabilidade das bactérias, suprimiu 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,

porém não no mesmo grau que tem sido relatado para o tratamento com antibióticos sob condições similares.

Alguns estudos em animais e estudos clínicos têm introduzido a terapia fotodinâmica na prática da Periodontia como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico (Sousa, 2007; Tavares *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2016).

Qin *et al.*, (2008) 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 $12\text{J}/\text{cm}^2$, ou com RAR. A eficácia da terapia foi avaliada pela redução bacteriana, alterações histológicas e alteração dos tecidos periodontais. Como resultado, observaram redução bacteriana significativa 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.

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 tratados com: TFD (cloreto fenotiazínico como fotossensibilizador), RAR ou RAR + TFD. Amostras de biofilme 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- α , RANKL, osteoprotegerina, MMP-1, interleucina 6, interleucina 10 e a carga bacteriana total pela análise do rRNA 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 *Aa* 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.

De Oliveira *et al.* (2016), realizaram um estudo avaliando o efeito adjunto da TFD antimicrobiana associada a RAR em doença periodontal induzida em ratos. A doença

periodontal foi induzida com a inserção de ligadura nos molares inferiores de 60 ratos. Após 14 dias de indução da doença, as ligaduras foram removidas e os animais foram divididos em 6 grupos: 1) sem tratamento; 2) RAR; 3) LED; 4) RAR + TFD; 5) TFD e 6) eritrosina. Os animais foram eutanizados com 3, 7 e 15 dias após indução da doença. Na análise histomorfométrica da perda óssea linear o grupo da RAR + TFD mostrou uma diferença significativa com relação aos outros grupos experimentais após 3 e 15 dias, além de apresentar um menor número de células TRAP⁺ quando comparado ao grupo que recebeu só raspagem, após 3 dias. Os autores concluíram, que a TFD associada a RAR mostrou melhores resultados terapêuticos no tratamento da doença periodontal em ratos.

No intuito de avaliar a ação antimicrobiana da TFD quando associado com a RAR, Andersen *et al.*, (2007), através de um estudo clínico, verificaram que a terapia combinada RAR + TFD (laser diodo; 670nm; 150mW; 60 segundos; 10-20J/cm² 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 0,86mm; redução na PS de 1,11mm 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 0,36mm; redução na PS de 0,74mm e melhora no SS de 56%.

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/cm², 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 as 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 unirradiculres e pode ser uma estratégia terapêutica alternativa na terapia periodontal de suporte.

No entanto, alguns trabalhos têm mostrado resultados controversos a respeito dos efeitos benéficos da TFD como auxiliar a terapia convencional (Oliveira *et al.*, 2007; Christodoulides *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2008; Lopes *et al.* 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Al-zahrani *et al.*, 2009; Macedo, 2009; Chondros *et al.*, 2009; Lulic *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2010).

De Almeida *et al.*, (2007) avaliaram através de microscopia óptica e análise radiográfica, o efeito da terapia fotodinâmica no controle 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). 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/cm². 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.

Oliveira *et al.*, (2007) não encontraram diferenças clínicas entre pacientes com periodontite agressiva tratados com TFD isoladamente (*laser* diodo 660nm; 60mW/cm²; 10 segundos e cloreto de fenotiazina a 10mg/ml) ou com RAR apenas. Os pacientes tratados com TFD não receberam a RAR. Posteriormente, ao analisarem o nível de citocinas (TNF-α 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.

Braun *et al.*, (2008) estudaram vinte pacientes portadores de periodontite crônica não tratados, onde todos os dentes receberam terapia periodontal tradicional. Por meio de um modelo de boca dividida, dois quadrantes (grupo teste) foram adicionalmente tratados com terapia fotodinâmica. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significantes, entre os grupos para profundidade de sondagem, sangramento a sondagem e nível de inserção relativo após uma semana. Entretanto, houve uma redução significativa para os valores dos mesmos parâmetros clínicos após três meses de tratamento no grupo controle, com um maior impacto sobre os sítios tratados com a TFD como adjuvante.

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 CO₂, 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/cm²; 1 minuto e cloreto de fenotiazina 10mg/ml). As variáveis clínicas IP, PS, NIC, recessão gengival, 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 0,6mm aos 3 meses e 0,8mm aos 6 meses; os valores correspondentes ao NIC foram 0,5mm aos 3 meses e 0,7mm aos 6 meses. No grupo controle essas mudanças aos 3 e 6 meses foram respectivamente de 0,6mm 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.

Oliveira *et al.* (2009), estudaram dez pacientes que foram aleatoriamente tratados com TFD ou RAR objetivando mensurar os níveis de TNF- α e RANKL no fluido gengival após a execução de ambas terapias. Amostras do fluido foram coletados, e as concentrações de TNF- α e RANKL foram determinados pelo ELISA. Encontrou-se reduções

estatisticamente significantes no nível de TNF- α 30 dias após o tratamento, com ambas modalidades terapêuticas, entretanto os valores de redução foram semelhantes entre o TFD e a raspagem.

Em um estudo clínico controlado, duplo-cego e randomizado, Lulic *et al.* (2009) avaliaram o efeito da TFD em pacientes em manutenção periodontal, apresentando pelo menos um sítio com PS residual ≥ 5 mm com ou sem sangramento. Para tanto, os autores selecionaram pacientes em terapia de suporte periodontal e os pacientes foram divididos em dois grupos: 1) RAR + TFD e 2) RAR + fotossensibilizador + frequência do *laser* que não fotoativava o cloreto de fenotiazina. O fotossensibilizador (cloreto de fenotiazina) foi aplicado nas bolsas periodontais (3 minutos de pré-irradiação), e em seguida fotoativado (*laser* de diodo com comprimento de onda de 670nm e 75mW/cm² de densidade de energia) por um minuto. Esse procedimento foi realizado após a RAR no *baseline*, 1, 2, 7 e 14 dias, totalizando 5 aplicações. Os autores verificaram uma redução significativa na média da PS entre o *baseline* e seis meses após o tratamento. O tempo não influenciou a redução da PS no grupo RAR + fotossensibilizador + frequência do *laser* que não fotoativava o cloreto de fenotiazina. Após seis meses, foram detectadas maiores reduções na PS e ganho no NIC no grupo RAR + TFD quando comparado ao outro grupo. Os autores detectaram redução significativa de SS a favor do grupo RAR + TFD em 3, 6 e 12 meses. Os autores concluem que a repetição desse protocolo de TFD associado à RAR foi capaz de melhorar os padrões clínicos periodontais.

Sgolastra *et al.* (2013a,b), numa revisão sistemática com metanálise investigando trabalhos que avaliaram a eficácia e segurança da TFD antimicrobiana usada sozinha ou como adjuvante à RAR em pacientes com periodontite crônica, mostraram que a maioria dos trabalhos em 3 meses, mostraram uma diferença estatisticamente significativa no ganho do NIC e redução da PS quando a RAR foi associada a TFD enquanto nenhuma diferença foi encontrada para a TFD usada isoladamente. Aos 6 meses, no entanto, não foram observadas diferenças significativas para qualquer dos parâmetros investigados. Os autores concluíram que o uso da TFD como coadjuvante à RAR proporcionou benefícios a curto prazo. No entanto, não houve evidências suficientes na literatura investigada para apoiar a eficácia da TFD como adjuvante a RAR a longo prazo. Mais estudos clínicos, randomizados controlados são necessários para considerar a TFD como um tratamento confiável, rotineiro e previsível na prática clínica.

Como pode-se observar, existem muitos trabalhos na literatura acerca do uso da TFD na Periodontia, porém sem um protocolo ideal definido quanto ao melhor

fotosensibilizador, concentração do corante e tempo necessário de pré-irradiação ou de exposição do corante à luz. Por isso, se faz necessária a busca de novas substâncias que possam ser utilizadas como fotosensibilizador nos procedimentos de TFD com finalidade de potencializar o efeito antimicrobiano sobre o biofilme periodontal. Uma das opções bastante estudadas é a curcumina, que tem sido descrita em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e antifúngico (Abe *et al.*, 1999; Ramsewak *et al.*, 2000; Literat *et al.*, 2001; Ushoa *et al.*, 2007).

2.2.6 Uso da curcumina como Fotossensibilizador

A curcumina é um componente fenólico, membro da família curcuminóide, o qual pode ser extraída de rizomas da *Curcuma Longa* (Dovigo *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Quishida *et al.*, 2015). A curcumina tem sido tradicionalmente usada como tempero culinário (Downham & Collins, 2000), mas muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que a curcumina tem um grande potencial terapêutico, incluindo efeito anti-inflamatório (Epstein *et al.*, 2010), antisséptico (Dahl *et al.*, 1989), antifúngico (Dovigo *et al.*, 2011a,b), antioxidante (Tonnesen *et al.*, 1987; Jayaprakasha *et al.*, 2006) e especialmente efeito antiviral contra a hepatite B (Jim Kim *et al.*, 2009) e H1N1 (Chen *et al.*, 2010).

A curcumina foi isolada do rizoma da planta *Curcuma longa L.* pela primeira vez por Vogel em 1842, e obtida em forma cristalina em 1870. É um composto considerado hidrofóbico, insolúvel em água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido) e pode sofrer rápida degradação em várias condições (Pereira & Stringheta, 1998; González, 2012). Devido aos efeitos tóxicos apresentados pelos solventes orgânicos etanol e DMSO, pesquisas têm sido desenvolvidas para encontrar a melhor forma de diluição da curcumina em solução aquosa, com solubilidade e estabilidade aceitáveis. Estudos como de Bhawana *et al.* (2011) e de Abdel *et al.* (2012) vêm avaliando métodos de nanoparticularização ou de alteração molecular da estrutura da curcumina para torná-la solúvel em água.

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 *et al.* (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 intuito de conseguir uma ótima solubilidade da curcumina em água, Bhawana *et al.* (2011) incorporaram moléculas de curcumina a nanopartículas. Os autores avaliaram a eficácia antimicrobiana de soluções com microconcentrações de curcumina diluídas em água (nanoparticulada) e em DMSO (natural) e observaram que menores concentrações inibitórias mínimas de soluções com curcumina nanoparticulada eram necessárias para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*. Da mesma forma, o halo de inibição desses microrganismos, mostrou ser maior na solução nanoparticulada quando testadas soluções com curcumina natural diluída em DMSO e nanoparticulada. Os autores acreditam que a melhor ação antimicrobiana ocorreu devido ao tamanho reduzido das nanopartículas (2-4nm), permitindo uma melhor penetração celular, enquanto as dissolvidas em DMSO eram significativamente maiores (500-800nm). Além disso, os autores hipotetizaram que, devido ao tamanho das nanopartículas de curcumina, as mesmas se ancoraram à parede bacteriana, rompendo-a e, assim, penetrando na célula e lesando a estrutura dos componentes internos celulares, aumentando ainda mais sua efetividade.

Jagetia & Aggarwal (2007), numa revisão de literatura abordaram os os efeitos da curcumina no sistema imunológico. Os autores mostraram que a curcumina apresenta um efeito imunomodulador nas células e que modular a ativação de células T e B, macrófagos, neutrófilos, células natural killers (NK) e células dendríticas. Além disso, os autores mostraram que a curcumina tem funções de imunomodular a resposta de citocinas e quimiocinas reduzindo a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e de interleucinas pró-inflamatórias (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e inativando a transcrição de fator NF- κ B.

Estudos também têm sugerido que alguns dos efeitos terapêuticos da curcumina são acentuados com a sua exposição a uma fonte de luz (Wilson & Mía, 1994; Cavalcante *et al.*, 2009). 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).

O mecanismo fotossensibilizador da curcumina ainda não é bem conhecido, mas parece depender da presença de oxigênio para que ocorra (Dahl *et al.*, 1989; Tønnesen *et al.*, 1987). Atualmente, sabe-se que o efeito citotóxico das moléculas de curcumina submetidas à fotossensibilização ocorrem devido à produção de formas tóxicas de oxigênio, como oxigênio singleto (Chignell *et al.*, 1994), peróxido de hidrogênio e superóxido (Dahl *et al.*, 1989; Dovigo *et al.*, 2011).

Dahl *et al.* (1989) avaliaram o efeito citotóxico da curcumina na presença da luz em suspensões de bactérias gram-positivas (*Sacrina lutea*, atualmente denominada de *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*) e sobre bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). Os autores verificaram uma maior ação citotóxica da curcumina fotoativada sobre as bactérias gram-positivas, sendo o *Staphylococcus aureus* a bactéria que melhor respondeu à terapia. Além disso, foi observado que a reação de fotoativação da curcumina não produz oxigênio singlete, mas sim peróxido de hidrogênio que, apesar de ser menos citotóxico, possui período de ação relativamente mais longo participando ativamente no efeito antimicrobiano desse protocolo. Os autores relataram também que a curcumina, quando utilizada sozinha, mostrou ter efeito bactericida somente em concentrações muito elevadas e, quando iluminada, exerceu potentes efeitos fototóxicos em quantidades micromolares. Outro aspecto importante destacado nesse estudo, foi que o tempo de pré-irradiação da curcumina, ou seja, o período requerido para o corante permanecer em contato com o micro-organismo antes da irradiação, não teve efeito significativo na redução das espécies bacterianas estudadas.

Dovigo *et al.*, (2011a) 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 e biofilme de *C. albicans* foram expostas a nove concentrações de curcumina (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 μ M) e sete doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4J/cm²). O efeito de diferentes tempos de pré-irradiação (5 e 20 minutos), a possível captação de curcumina pelas células fúngicas e participação do oxigênio singlete na fotoinativação também foram avaliados. O tempo de ativação utilizado foi de 29 minutos. Os resultados mostraram que as suspensões planctônicas de *C. albicans* foram completamente inativadas com a utilização de 20 μ M de curcumina e 5,28J/cm² e o tempo de pré-irradiação não influenciou na inativação do micro-organismo. Sobre o biofilme de *C. albicans*, o efeito fotodinâmico foi acentuado pela presença da curcumina durante a iluminação e uma redução significativa foi observada após a utilização de 20 minutos de pré-irradiação, concluindo que para ser efetivo e alcançar camadas mais internas do biofilme se faz necessário um tempo de pré-irradiação maior.

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 significativa entre os dois grupos experimentais com relação à efetividade da redução bacteriana. No grupo só curcumina (9%), a redução bacteriana foi consideravelmente menor do que no grupo TFD, que apresentou 68% de redução. 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.

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 do fotossensibilizador), aplicação apenas do LED (grupo da luz) e o grupo que recebeu tanto a luz quanto a corante (grupo da TFD). Duas diferentes concentrações de curcumina foram testadas (0,75 and 1,5g/L) associado com um LED com 5,7 J/cm² 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.

Ribeiro *et al.*, (2013), investigaram o efeito da TFD da curcumina em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) comparado ao *S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA) e fibroblastos L929. Suspensões de MSSA and MRSA foram tratados com diferentes concentrações de curcumina (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20µM) e expostos à luz LED. Diluições seriadas foram feitas 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 20µM em combinação com o LED resultou em morte de MSSA. Entretanto, apenas a concentração de 20µM 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 reduzir o número de MRSA.

Paschoal e colaboradores (2013), estudaram o efeito da TFD *in vitro* na viabilidade de *S. mutans* em suspensão planctônica, utilizando curcumina como fotosensibilizador e luz LED azul. Suspensões de 0,5mL contendo 1×10^7 UFC mL⁻¹ foram preparadas e divididas em quatro grupos: 1) grupo controle (sem tratamento), 2) grupo curcumina sem luz (aplicação de curcumina em três concentrações: 2000 µM, 4000 µM e 8000 µM e três condições experimentais), 3) grupos luz sem curcumina (irradiação do LED em três dosagens: 24, 48 e 72 J/cm² e três condições experimentais) e 4) grupo TFD (curcumina nas respectivas concentrações combinada com as dosagens do LED e nove condições experimentais). Após cultura em placas de Petri e incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia foi realizada. Os resultados mostraram que todas as associações de curcumina e LED foram capazes de diminuir o número de bactérias viáveis comparadas ao grupo controle. Uma redução significativa de *S. mutans* foi alcançada com a associação de 4000µM de curcumina e exposição à 48 e 72J/cm², promovendo reduções de 60,66% e 71,07%, respectivamente. Apesar desses resultados, uma diminuição na contagem bacteriana com a curcumina na concentração de 8000µM, mostrou que a taxa de morte bacteriana não demonstrou efeito acumulativo, indicando uma relação não dependente da dose. Os grupos só com curcumina e só a irradiação da luz não apresentaram uma redução significativa da contagem bacteriana. Os autores concluíram que a curcumina associada a TFD foi capaz de reduzir o número de células viáveis da bactéria *S. mutans*.

Gomes-Filho *et al.*, (2016), avaliaram os efeitos da curcumina como fotosensibilizador na TFD na viabilidade dos fibroblastos e produção de citocinas (IL-1β e IL-6). Para o teste de citotoxicidade os grupos foram divididos em: 1) meio de cultura (controle); 2) hipoclorito de sódio 5%; 3) solução salina e 4) TFD (500mg/L curcumina + LED azul). A curcumina foi aplicada e aguardou-se um período de 1 minuto de pré-irradiação. Em seguida o corante foi fotoativado por 5 minutos. As soluções foram diluídas em meio de cultura DMEM (1x10⁴ células) e colocadas em placas de 24 poços, com linhagem de fibroblastos de camundongos (L929). Depois de 6, 24 e 48 horas, o ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular e o ensaio de ELISA foi utilizado para avaliação de citocinas no sobrenadante. A TFD e a solução salina apresentaram baixo efeito citotóxico, similar ao grupo controle; enquanto o hipoclorito de sódio a 5% foi mais citotóxico que a TFD em todos os períodos de tempo. Todos os materiais expressaram similarmente IL-1β e IL-6 independente do período experimental. Os autores concluíram que a curcumina associada à

uma fonte de luz não foi citotóxica em cultura de fibroblastos L929 e em todos os grupos houve expressão similar de IL-1 β e IL-6.

Semelhante aos resultados encontrados por Dovigo e colaboradores em 2011, 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 40 μ M) 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 20 μ M 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 40 μ M 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.

Najafi *et al.* (2016), realizaram um estudo *in vitro* comparando os efeitos antimicrobianos do digluconato de clorexidina (2%), curcumina (5mg/ml), da luz LED (120J/cm²) e do LED + curcumina (120J/cm² + 2,5mg/ml) sobre a espécie *Aa*. Todos os tratamentos apresentaram uma boa atividade antimicrobiana, sendo a clorexidina a que apresentou melhores resultados, seguidos pela curcumina associada ao LED, a curcumina sozinha e por fim o LED sozinha. Todos os grupos mostraram diferenças estatisticamente significantes, exceto para o grupo do LED sozinha. Os autores concluíram que a curcumina é uma substância eficaz na prevenção do crescimento da *Aa*, cujo impacto é reforçado quando utilizado simultaneamente com a luz.

Aplicação da curcumina em modelos experimentais

Estudos pré-clínicos em animais têm sido realizados para avaliar a ação da curcumina nos tecidos periodontais e sua influência no controle da inflamação (Guimarães *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Côrrea *et al.*; 2016).

Guimarães e colaboradores em 2011, avaliaram a ação da curcumina sobre os tecidos periodontais em periodontite experimental em ratos. A doença periodontal foi induzida em 60 ratos, a partir da inserção de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores. Os animais foram divididos em 6 grupos: 1) sem ligadura; 2) só ligadura; 3) 30mg/kg de curcumina sem ligadura; 4) 30mg/kg de curcumina com ligadura; 5) 100mg/kg de curcumina sem ligadura e 6) 100mg/kg de curcumina com ligadura. A curcumina foi administrada intragastricamente por 15 dias. A reabsorção óssea foi avaliada por microtomografia computadorizada e o padrão inflamatório foi avaliado por estereometria. Para determinar a expressão de IL-6, TNF- α e síntese de prostaglandinas E₂ (PGE₂) no tecido gengival foram feitos testes de ELISA e qPCR. A reabsorção óssea foi efetivamente induzida no período experimental, mas não foi afetada por qualquer uma das doses de curcumina. A curcumina mostrou uma redução efetiva no infiltrado de células inflamatórias e aumento no conteúdo de colágeno e no número de células fibroblásticas. No entanto, a reabsorção óssea não foi afetada pela administração de curcumina, que também não modulou de forma marcante a expressão de RANKL nos tecidos gengivais.

Zhou *et al.* (2013), avaliaram se a administração intragástrica de curcumina pode inibir a inflamação e a reabsorção óssea alveolar em periodontite experimental induzida por ligadura em ratos. Trinta ratos Wistar foram divididos em três grupos: sem colocação de ligadura e administração de solução salina; ligadura e solução salina e ligadura e curcumina. Doses de 100mg/kg da curcumina foi administrada diariamente por 30 dias. Após eutanásia dos animais, as mandíbulas foram coletadas para análises morfológicas, histológica e imunohistoquímica. Os tecidos gengivais também foram coletados para avaliação das citocinas. A reabsorção óssea foi significativamente maior nos animais onde foram administrados solução salina comparado ao grupo que recebeu tratamento com curcumina ou o grupo controle. Além disso níveis de expressão de RANK, RANK-L, osteoprotegina (OPG), TNF- α e interleucina-6 (IL-6) foram maiores nos animais tratados apenas com solução salina comparado ao grupo tratado com curcumina ou o grupo controle. Sendo assim, os autores concluíram que a curcumina pode diminuir a perda óssea alveolar na periodontite experimental induzida em

ratos via supressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e moléculas relacionadas à osteoclastogênese (RANKL e RANK).

Com o objetivo de investigar o efeito da administração contínua de resveratrol e curcumina e a associação de ambos na progressão da periodontite experimental em ratos, Corrêa *et al.* (2016), utilizaram 40 ratos Wistar que foram divididos nos seguintes grupos de tratamento: grupo 1 – periodontite experimental + placebo; grupo 2 – periodontite experimental associado ao resveratrol; grupo 3 – periodontite experimental + curcumina e grupo 4 – periodontite experimental + resveratrol + curcumina. A periodontite foi induzida nos ratos pela inserção de ligaduras de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores e aplicações diárias de solução placebo, 10mg/kg de resveratrol, 100mg/kg de curcumina ou 10mg/kg de resveratrol + 100mg/kg de curcumina foram feitas do dia 0 ao dia 30. No final do período experimental os animais foram eutanaziados e as mandíbulas foram processadas para análises morfométricas de perda óssea e o tecido gengival ao redor dos primeiros molares foram coletados para quantificação de interleucina (IL-1 β), IL-4, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) usando ensaio de Luminex/MAGPIX. O resultado morfométrico revelou maior perda óssea no grupo placebo quando comparado com os grupos resveratrol, curcumina e curcumina associada ao resveratrol. Não houve diferença na perda óssea entre os grupos resveratrol, curcumina e curcumina + resveratrol. O ensaio imunoenzimático do tecido gengival mostrou uma menor concentração de IL- β no grupo curcumina + resveratrol em comparação com o grupo placebo. Valores maiores de IL-4 foram demonstrados nos grupos resveratrol, curcumina e curcumina + resveratrol em comparação com o grupo placebo. Apenas o grupo resveratrol mostrou uma redução nos níveis de IFN- γ . Não houve diferença na concentração de TNF- α para os quatro grupos. Os autores concluíram que o resveratrol e curcumina são capazes de reduzir a perda óssea alveolar no modelo experimental de periodontite em animal, quando usados isolados ou em combinação um com o outro, mas parece não mostrar efeitos sinérgicos ou adicionais.

Estudos clínicos da curcumina

Atualmente, alguns trabalhos clínicos têm sido publicados utilizando a curcumina como coadjuvante à terapia periodontal não cirúrgica e como fotosensibilizador na TFD (Bhatia *et al.*, 2014; Hugar *et al.*, 2016; Elburki *et al.*, 2016).

Bhatia *et al.*, (2014), avaliaram a eficácia clínica e microbiológica da liberação local de gel de curcumina 1% como adjunto à RAR no tratamento da periodontite crônica. O

grupo teste recebeu gel de curcumina a 1% associada a RAR e o grupo controle recebeu apenas RAR. Os parâmetros clínicos de IP, SS, PS e NIC foram avaliados e amostras microbiológicas foram tomadas no baseline, 1, 3 e 6 meses. O gel de curcumina forneceu melhoras significantes nos parâmetros clínicos avaliados e a contagem microbiana mostrou uma redução significativa de *Pg*, *Pi*, *Fn* e *capnocytophaga* após 6 meses quando comparados com o grupo controle. Dessa forma, os autores concluíram que a aplicação de gel de curcumina a 1% foi mais efetiva na redução de periodontopatógenos quando usado como coadjuvante à RAR no tratamento da periodontite crônica.

Sreedhar *et al.*, (2015), compararam a ação da curcumina sozinha e como fotosensibilizador na TFD, como adjunto ao debridamento ultrassônico, com o debridamento sozinho no tratamento de quinze pacientes com periodontite crônica. O estudo foi de boca dividida, e cada quadrante recebeu as seguintes modalidades de tratamento: quadrante 1) debridamento ultrassônico; quadrante 2) Debridamento associado à curcumina em gel (5 minutos de aplicação); quadrante 3) Curcumina (5 minutos) associada ao LED azul (5 minutos de irradiação) no dia “0” e quadrante 4) Curcumina (5 minutos) associada ao LED azul (5 minutos de irradiação) nos dias 0, 7 e 21. O debridamento foi realizado em uma única sessão. Os parâmetros clínicos avaliados foram: IP, SS, sangramento gengival, PS e NIC. Todos os parâmetros foram avaliados no baseline e 3 meses após o tratamento. Os sítios com maiores PS foram selecionados de cada quadrante para amostras bacterianas e cultura para *Aa*, *Pg* e *Pi*. Os sítios tratados com curcumina associada ao LED, mostrou um efeito significativo na redução dos patógenos periodontais quando comparados com os sítios tratados apenas com o debridamento ou com a curcumina sem ativação da luz. O estudo mostrou também que os resultados nos parâmetros clínicos e microbiológicos foram melhorados quando múltiplas aplicações de TFD foram feitas.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da aplicação do gel de clorexidina e o gel de curcumina como adjunto à RAR, Hugar *et al.*, (2016) conduziram 30 pacientes com periodontite crônica em dois grupos: RAR + gel de clorexidina 0,2% (grupo controle) e RAR + gel de curcumina 2%. O desenho experimental foi boca dividida e todos os pacientes foram tratados com RAR e após esse procedimento receberam, nos respectivos lados, tratamento com gel clorexidina e gel curcumina no interior das bolsas periodontais. Índice de placa, SS, PS foram registrados no baseline, 30 e 45 dias após o tratamento. Os resultados revelaram que ambos os tratamentos tiveram efeito sobre bolsas periodontais de média a moderada, mas uma maior redução foi observada no grupo que recebeu o gel de curcumina do que no grupo que recebeu tratamento com gel de clorexidina. Os autores concluíram que as duas terapias podem

ser usadas como adjunto à terapia periodontal não cirúrgica, porém o gel de curcuma 2% foi mais efetivo do que o gel de clorexidina 1% no tratamento de bolsas periodontais médias a moderadas com uma redução significativa dos parâmetros avaliados.

Diante do exposto, a curcumina tem mostrado resultados satisfatórios como antimicrobiano e como agente imunomodulador do processo inflamatório quando associado à uma fonte de luz, podendo ser utilizada como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas como a doença periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos:

- I. Determinar um protocolo de aplicação da curcumina como fotosensibilizador na TFD.
- II. Avaliar, morfometricamente, a ação da curcumina na TFD como coadjuvante a terapia periodontal não-cirúrgica no reparo ósseo de dentes acometidos por periodontite experimental induzida em ratos.
- III. Avaliar a ação antimicrobiana da curcumina sozinha e associada à uma fonte de luz sobre o biofilme dentário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fase experimental *in vitro*

Determinação da concentração e tempo de fotosensibilização do corante

O fotossensibilizador utilizado nesse estudo foi a curcumina/sacarose. O corante foi proveniente da empresa farmacêutica PDT Pharma[®], Cravinhos, Brasil e consistiu de uma variação molecular da curcumina, a qual na tentativa de melhorar as suas características de solubilidade em água e minimizar os efeitos tóxicos provocados por solventes orgânicos, como o etanol e o DMSO, incorporou-se o insumo em sacarose. O sachê com o pó do corante, continha curcumina/sacarose numa concentração de 1%.

Dessa forma, no intuito de criar um protocolo para utilização da curcumina como fotossensibilizador na TFD, foram testadas duas diferentes concentrações (0,01% e 0,5%) e dois diferentes tempos de fotoativação da curcumina (1 e 5 minutos). Para isso, inicialmente a curcumina foi diluída em água destilada, segundo orientações do fabricante, de forma que se obtivesse uma concentração final de 0,01% e 0,5%. Uma vez diluída a curcumina, a solução foi acondicionada em frascos âmbar envoltos em papel alumínio para que não sofressem influência da luz ambiente.

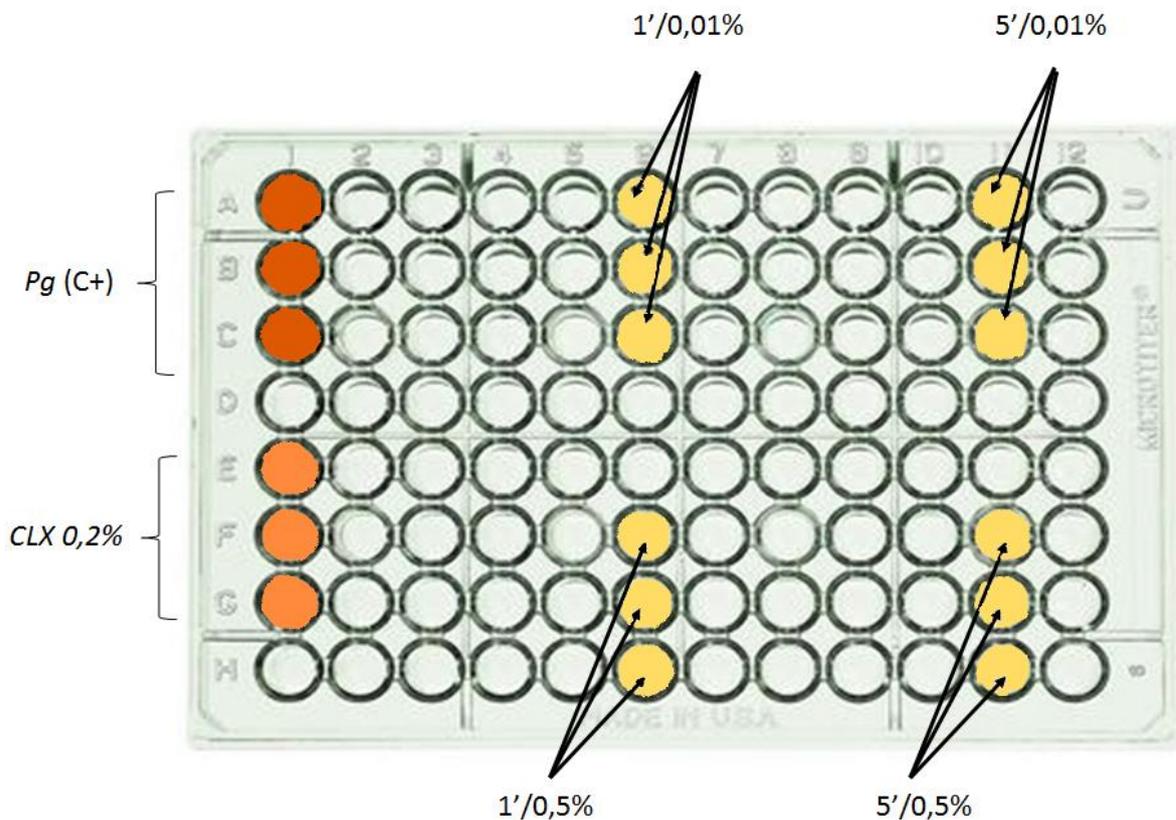
Para determinação da concentração do corante e tempo de fotoativação, a análise foi feita *in vitro* sobre cepas de *Pg* (Strain ATCC BAA-308/W83). Estas estavam criopreservadas a - 80°C e foram inoculadas em meio ágar Brucella (Acumedia[®]) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (New Prov[®]), 0,2% de extrato de levedura (Acumedia[®]), 5µg/mL de solução de hemina (Sigma[®]) e 1µg/mL de solução de vitamina K (Sigma[®]), seguindo-se de incubação em câmara de anaerobiose (Plas Lab[®]) em atmosfera de 85% N₂, 5% de CO₂ e 10% H₂ à temperatura de 37°C, por 4 dias.

Após o desenvolvimento das colônias bacterianas, essas foram transferidas para tubos contendo 10ml de Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Acumedia[®]) suplementado com 0,6% de extrato de levedura, 5µg/mL de hemina e 1µg/mL de vitamina K. Após três dias de incubação em anaerobiose, alíquotas de 100µl do caldo contendo o micro-organismo foram inoculadas em uma placa de cultura de 96 poços preta (Brand[®]) juntamente com 100µl de meio puro. A placa foi então incubada em câmara de anaerobiose por mais 18 horas.

Após esse tempo, as seguintes amostras foram aplicadas na placa: somente *Pg* (C^+), clorexidina a 0,2%, curcumina a 0,01% por 1 minuto, curcumina a 0,01% por 5 minutos, curcumina a 0,5% por 1 minuto e curcumina a 0,5% por 5 minutos. Alíquotas de 50 μ l de cada amostra foram inoculadas em triplicata nos poços (Figura 3).

Nos poços que continham a curcumina, inicialmente aguardou-se um tempo de 1 minuto de pré-irradiação e em seguida a luz foi incidida por 1 e 5 minutos nos respectivos poços. Após realização dessa fase experimental a placa foi preparada para quantificação bacteriana no qPCR real time.

Figura 3 – Desenho esquemático representando a fase experimental *in vitro* da determinação da concentração e tempo de fotoativação do corante.



4.2 Fase experimental *in vivo*

4.2.1 Animais

O estudo incluiu trinta e quatro ratos Wistar, machos, com idade de doze semanas e pesando de 300-350g, adquiridos do CEMIB-Unicamp (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório). Os animais foram acondicionados no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) e 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).

4.2.2 Delineamento do estudo

Dos trinta e quatro animais utilizados no experimento, trinta receberam, no *baseline*, ligaduras em um dos primeiros molares inferiores para indução da periodontite experimental. Os outros quatro animais não receberam ligadura e nenhum tipo de tratamento, sendo alocados no grupo controle negativo (CN). Todos os animais foram eutanasiados 14 dias após a indução da doença periodontal (Figura 4).

Figura 4 – Delineamento do estudo.



4.2.3 Indução da periodontite experimental

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®; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3ml/kg) (Virbaxil®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil).

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, um espaçador endodôntico modificado foi introduzido entre o 1º e o 2º

molares inferiores, em um dos lados, escolhido por sorteio, para que fosse obtido um espaço entre os dentes para posterior inserção das ligaduras de algodão (fio de algodão nº 10, Coats Corrente, São Paulo, BR). As ligaduras foram colocadas no *baseline*, ao redor dos primeiros molares inferiores, de forma que ficassem posicionadas o mais subgingival possível, com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme (Jonhson, 1975). Para fixação das ligaduras foram feitos três nós simples voltados para mesial.

4.2.4 Divisão dos grupos e aplicação das terapias

Sete dias após a indução da doença periodontal os animais foram anestesiados e divididos nos seguintes grupos:

- **Doença periodontal (n = 8)**

Os animais alocados nesse grupo, tiveram suas ligaduras removidas sete dias após a indução da doença periodontal e as mesmas foram coletadas e transferidas para microtubos de plástico (Eppendorf AG[®], Hamburg, Alemanha) contendo 450µl de solução fluida reduzida de transporte (RTF) (Syed & Loesche, 1972) para análise microbiológica.

- **RAR (n = 8)**

Uma vez removidas as ligaduras dos dentes dos animais pertencentes a esse grupo, a RAR foi realizada com o auxílio de curetas manuais Gracey Mini-Five 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy[®], Chicago, IL, EUA), ao redor de todo o dente, de forma que todo depósito de biofilme e/ou cálculo fosse removido. As ligaduras desse grupo, após removidas, foram descartadas.

- **RAR + TFD (n = 8)**

Nos molares que receberam tratamento com RAR + TFD, inicialmente foi feito a aplicação da terapia fotodinâmica sobre a ligadura, no intuito de removê-las posteriormente para análise microbiológica. O seguinte protocolo foi adotado para realização da TFD:

Fotossensibilizador

Como determinado anteriormente o fotossensibilizador utilizado no estudo foi a curcumina/sacarose a 0,01%. Uma vez diluída a curcumina, a solução foi acondicionada em frascos âmbar envoltos em papel alumínio para que não sofressem influência da luz ambiente.

Fonte de luz

O equipamento utilizado nesse experimento como fonte de luz foi um aparelho tipo LED (Optilight Max, Gnatus®, Ribeirão Preto/SP, Brasil). O aparelho possuía uma ponta de fibra óptica que emitia luz azul com comprimento de onda de 450nm, potência de 310mW e poder de densidade de 122,04mW/cm².

Nos dentes tratados com RAR + TFD, inicialmente 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 fotossensibilizador para o lado antagonista ou que o mesmo fosse deglutido pelo animal. Em seguida, 150µl da solução de curcumina a 0,01% foram aplicadas sobre a ligadura de forma que essa fosse totalmente embebida pelo corante. Aguardou-se um tempo de pré-irradiação de 1 minuto do produto e após esse período, a luz do LED foi incidida sobre a ligadura por mais 1 minuto para que ocorresse a fotoativação do fotossensibilizador. Em seguida a ligadura foi removida e colocada em microtubos contendo 450µl de RTF para análise microbiológica.

Após remoção da ligadura foi realizada a raspagem e alisamento radicular com o auxílio de curetas manuais Gracey Mini-Five 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) e posteriormente foi realizada mais uma aplicação da terapia fotodinâmica primeiro com 1 minuto do corante no sulco gengival, seguida da irradiação da fibra de luz por mais 1 minuto.

- **Curcumina (n = 6)**

Nos dentes que receberam tratamento somente com curcumina, inicialmente realizou-se um isolamento relativo na região lingual dos primeiros molares ligados com uma gaze a fim de que não houvesse escoamento do fotossensibilizador para o lado antagonista ou que o mesmo fosse deglutido pelo animal. Em seguida, 150µl da solução de curcumina a 0,01% foram aplicadas sobre a ligadura de forma que essa fosse totalmente embebida pelo corante. Aguardou-se um tempo de ação de 1 minuto do produto e após esse período as

ligaduras foram removidas e colocadas em microtubos contendo 450µl de RTF para análise microbiológica. Após remoção da ligadura foi realizada uma nova aplicação da curcumina no interior do sulco gengival por 1 minuto e em seguida o excesso do corante foi removido com uma gaze.

4.2.5 Eutanásia dos animais

Sete dias após a realização dos tratamentos os animais que receberam tratamento e os pertencentes ao grupo CN 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) e eutanasiados por decaptação. As mandíbulas foram removidas e separadas em sua sínfise e todo o tecido mole ao redor das hemimandíbulas foi retirado.

4.3 Preparo das mandíbulas para análise morfométrica

As hemimandíbulas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 8%, por 4 horas para que todo resíduo de tecido mole fosse removido. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente e secas. Posteriormente, as mesmas foram mergulhadas em solução de azul de metileno a 1% (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, USA) por 1 minuto, no intuito de demarcar a junção cimento-esmalte, e em seguida lavadas em água corrente para remoção do excesso do corante.

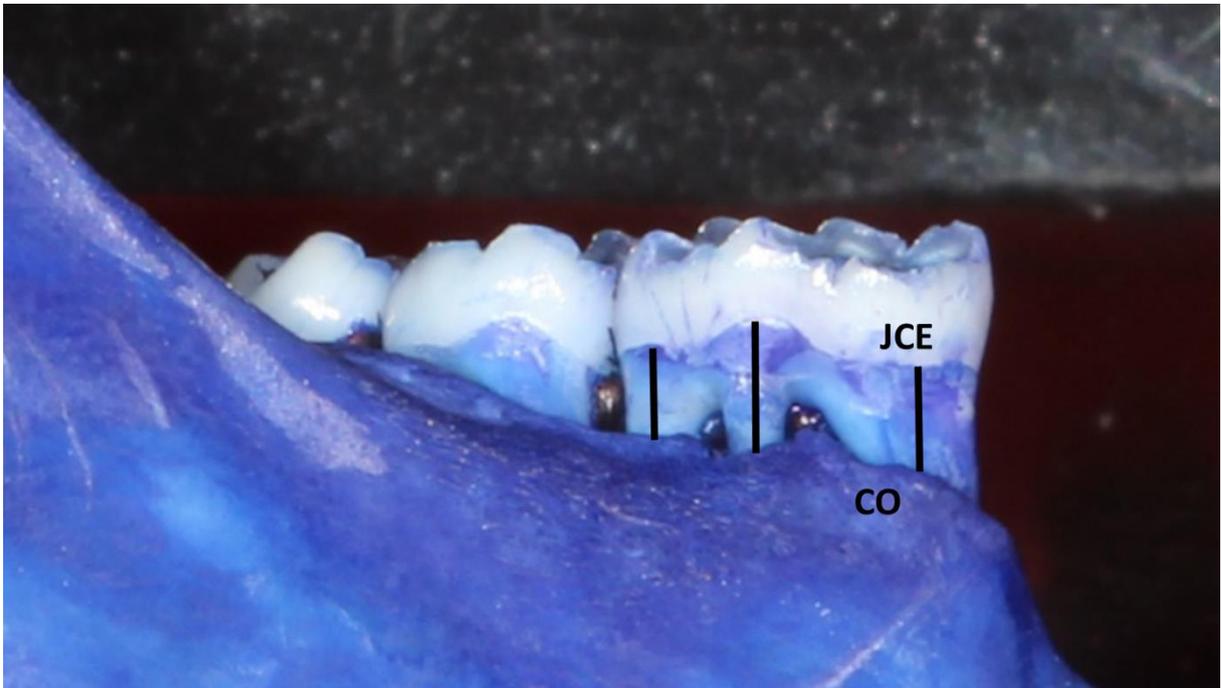
4.4 Avaliação morfométrica

Fotografias foram feitas com uma câmera digital de 6.1 megapixel (EOS 40D; Canon[®], New York, NY, USA) que foi colocada em um tripé para manter a câmera paralela ao chão na distância focal mínima. Os espécimes foram fixados em cera de forma que seus planos oclusais ficassem paralelos ao chão e perpendicular ao longo eixo da câmera. As fotografias das faces vestibulares foram feitas em ambos os lados, teste e controle. Para validar as conversões de medida, todas peças foram fotografadas ao lado de uma régua milimetrada.

O software ImageJ[®] foi usado para avaliar a perda óssea alveolar na face vestibular dos primeiros molares inferiores, medindo a distância da junção cimento-esmalte à

crista óssea, a partir da metade de cada raiz (Figura 5). A média da altura óssea alveolar de cada dente foi calculada.

Figura 5 – Imagem ilustrando a medida morfométrica. Linhas verticais nas raízes mostram as medidas lineares da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea (CO).



4.5 Calibração da Examinadora

Para avaliar a calibração da examinadora, previamente às leituras finais, foi realizada a correlação intraclasse das medidas de reabsorção. Dez imagens referentes à reabsorção foram aleatoriamente selecionadas e suas medições foram realizadas duas vezes dentro de 24 horas. A correlação intraclasse mostrou 96% de reprodutibilidade.

4.6 Cultura dos micro-organismos totais

As ligaduras que foram coletadas dos dentes onde só foram induzidas a doença periodontal e dos dentes que receberam os tratamentos com TFD e curcumina, foram agitadas em vórtex por aproximadamente 2 minutos para que houvesse o total desprendimento do biofilme da ligadura e sua dispersão. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, 50µl da suspensão foram retirados e diluídos em série decimal de 10^{-1} a 10^{-8} 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% N₂, 10% de CO₂ e 10% H₂) 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 e da curcumina sobre o biofilme dentário, inicialmente, a fim de promover a normalização dos dados, a análise estatística foi feita com os dados transformados em log₁₀. Isso significa dizer que a cada 1 log de redução houve uma redução microbiana de 10 vezes. Redução a partir de 1 log foi considerada com significância biológica. Para determinar se houve diferença entre os grupos de tratamento, utilizou-se o teste ANOVA one way/Tukey.

Para análise morfométrica, médias representativas de cada animal foram obtidas após os dados serem adquiridos. Os dados de reabsorção óssea alveolar foram inicialmente avaliados quanto à homogeneidade pelo teste de Shappiro-Wilk. Tendo detectado a homogeneidade, para análise intergrupo foi utilizado o teste ANOVA one way/Tukey.

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

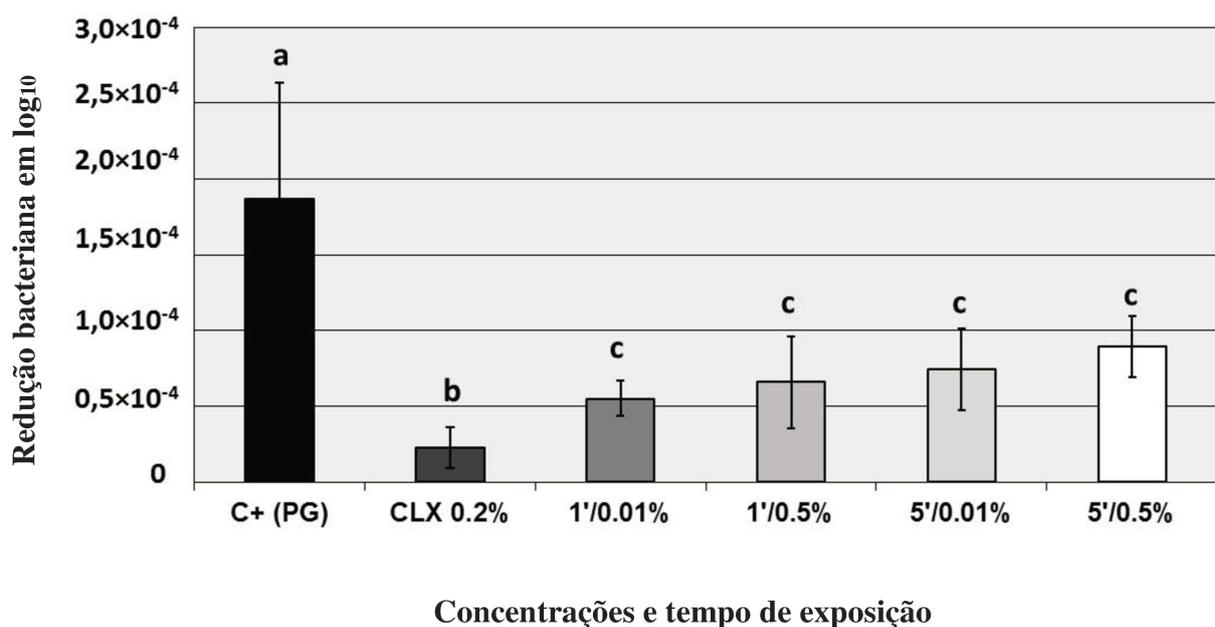
5 RESULTADOS

5.1. Concentração e tempo de fotoativação do corante

Na determinação da melhor concentração e tempo de fotoativação da curcumina, foi possível observar que tanto a clorexidina a 0,2% e todas as concentrações e tempo de ativação testados foram efetivos na redução bacteriana, mostrando uma diferença significativa quando comparados com a amostra contendo apenas a bactéria ($p < 0,01$). Diferenças significativas também foram observadas entre as diferentes concentrações e tempo e a clorexidina ($p < 0,01$), mostrando um resultado positivo para a clorexidina. No entanto, não foi possível observar diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações e tempo de fotoativação da curcumina ($p = 0,08$).

Diante disso, uma vez que a concentração de 0,01% e o tempo de fotoativação de 1 minuto foi suficiente para reduzir efetivamente a contagem bacteriana de *Pg*, esse foi o protocolo adotado para realização do presente estudo.

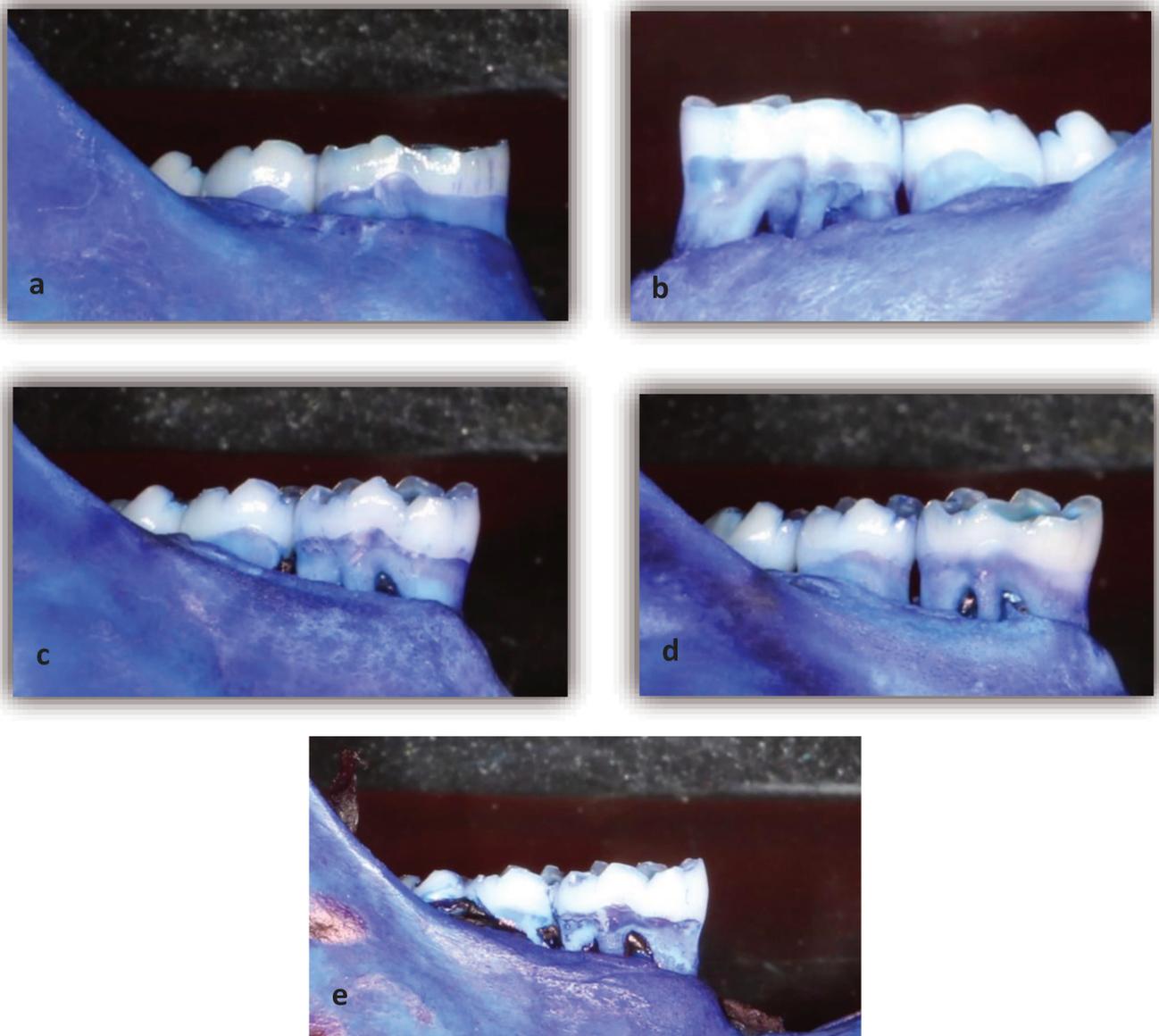
Gráfico 1 – Gráfico representativo da redução dos níveis bacterianos de *Pg* (\log_{10}) nas diferentes concentrações e tempo de ativação da curcumina. Clorexidina (CLX 0,2%), curcumina a 0,01% por 1 minuto (1'/0,01%), curcumina a 0,5% por 1 minuto (1'/0,5%), curcumina a 0,01% por 5 minutos (5'/0,01%), curcumina a 0,5% por 5 minutos (5'/0,5%). Letras distintas indicam que há diferença estatística intergrupo ($p < 0,01$). Letras iguais indicam que não há diferença significativa intergrupo ($p = 0,08$).



5.2 Avaliação morfométrica e microbiológica

Na avaliação morfométrica de todas as terapias testadas e nos dentes que receberam somente ligadura (DP), após 14 dias de estudo, foi possível observar uma área de reabsorção óssea alveolar provocado pela indução da doença periodontal. Nas mandíbulas que não receberam nenhum tipo de tratamento (CN) a média da distância da junção cemento-esmalte à crista óssea foram significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados aos animais que receberam somente ligadura e nos grupos que receberam ligadura e tratamento, refletindo assim a efetividade do modelo de periodontite induzida por ligadura aplicada nesse estudo (Figura 4).

Figura 4 – Imagens representativas ilustrando os achados morfométricos dos grupos: a) controle negativo (CN); b) doença periodontal (DP); c) raspagem e alisamento radicular (RAR); d) raspagem e alisamento radicular + terapia fotodinâmica RAR + TFD) e e) curcumina (CUR).



Entre os dentes que receberam somente ligadura e os tratados, houve também uma diferença estatística significativa ($p < 0.05$), mostrando que todos os tratamentos utilizados no estudo foram capazes de promover reparo ósseo. Contudo, não foram verificadas diferenças no padrão de reabsorção alveolar em todos os grupos de tratamento indicando que não houve um benefício adicional nos dentes tratados com RAR + TFD ou curcumina quando comparados com a RAR sozinha (Tabela 1).

Tabela 1: Média e desvio padrão da perda óssea (mm) para os grupos de tratamento, doença e controle negativo

Grupos	Perda óssea
CN	0,41±0,06A
DP	0,78±0,07B
RAR	0,70±0,12C
RAR + TFD	0,73±0,05C
CUR	0,71±0,06C

Letras maiúsculas distintas indicam que há diferença estatística intergrupo. Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa intergrupo (ANOVA/Tukey one way, $p < 0.05$).

Na quantificação da eficiência antimicrobiana dos tratamentos com TFD e curcumina sobre o biofilme dentário, observou-se que somente os dentes que receberam a TFD mostraram um resultado antibacteriano significativo sobre os microrganismos totais (Gráfico 2).

Nos dentes tratados com a TFD foi observada uma média de redução de 94% da contagem bacteriana quando comparados ao grupo doença periodontal ($p < 0,01$). Com a curcumina, entretanto, houve uma redução apenas de 11% da contagem microbiana, não sendo possível observar uma redução significativa na contagem dos microrganismos totais quando comparado aos dentes onde só foram induzidas a doença periodontal ($p > 0,05$) (Gráfico 3).

Sendo assim, considerando o número de molares que responderam positivamente ao tratamento, a TFD mostrou-se mais eficaz do que o tratamento com a curcumina sozinha ($p < 0,0001$).

Gráfico 2 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da redução bacteriana nos grupos doença periodontal (DP), curcumina (CUR) e terapia fotodinâmica (TFD) (\log_{10}). * $p < 0,01$

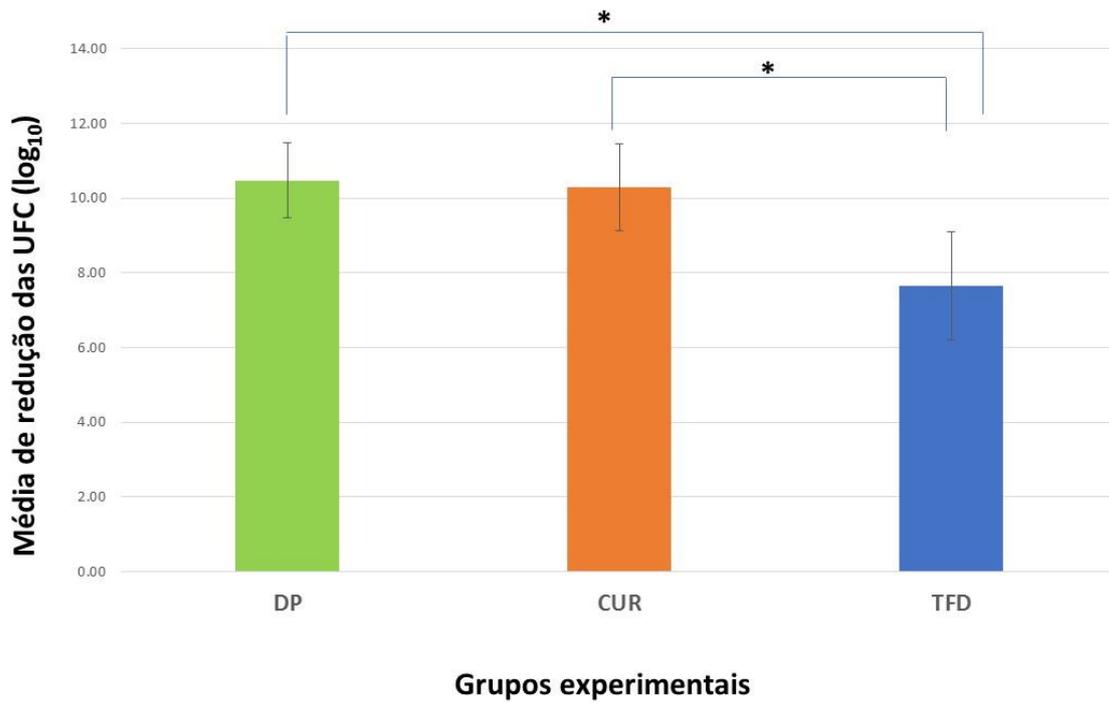
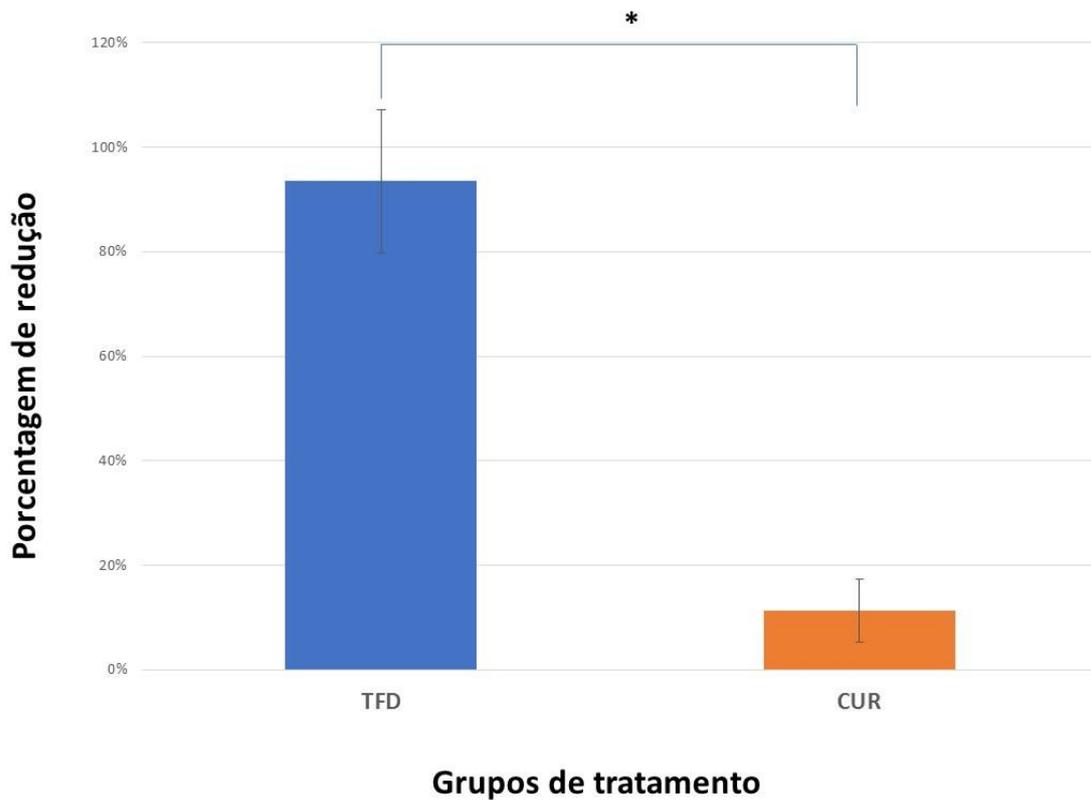


Gráfico 3 - Gráfico representativo das porcentagens da redução bacteriana nos grupos Terapia fotodinâmica (TFD) e curcumina (CUR). * $p < 0,0001$



6 DISCUSSÃO

A necessidade de procedimentos coadjuvantes à terapia periodontal convencional parece promover uma mobilização científica em busca de alternativas eficazes (Rosling *et al.*, 1986; Wennström, 1987; 1997; Verônica & Bissada, 1998; Ciancio, 1998; Van Steenberghe *et al.*, 1999). Embora o uso de antimicrobianos 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 na redução microbiana, utilizando como protocolo a curcumina/sacarose a 0,01% como fotosensibilizador e a ação dessa terapia como coadjuvante a RAR na reabsorção óssea de dentes acometidos por periodontite experimental em ratos.

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). Ainda não há um consenso na literatura acerca de um protocolo ideal para uso da TFD em Periodontia. A grande diversidade de trabalhos com diferentes metodologias tem mostrado uma grande variabilidade nos resultados. Portanto, pesquisas de novas substâncias fotossensibilizadoras que possam ser utilizadas nos procedimentos de TFD com finalidade de potencializar o efeito antimicrobiano sobre o biofilme periodontal se fazem necessárias.

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 (Richards *et al.*, 1999; Haukvik *et al.*, 2009). Nos resultados microbiológicos apresentados nesse estudo, o tratamento apenas com a curcumina não foi eficiente na redução bacteriana. No entanto, quando associada à uma fonte de luz esse resultado foi significativamente efetivo. Isso mostra que o efeito bactericida da curcumina só é acentuado quando utilizada em associação com a luz, como confirmado por outros estudos (Dahl *et al.*, 1994; Chignell *et al.*, 1994; Wilson & Mia, 1994; Cavalcante *et al.*, 2009).

Resultado semelhante também foi observado por Araújo *et al.*, (2012b) quando 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. 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/cm² de densidade de energia. Diminuições significativas na viabilidade de *S. mutans* foram observadas apenas nas suspensões bacterianas que foram expostas ao grupo da TFD.

Em um outro trabalho Araújo *et al.*, (2012a), avaliaram a susceptibilidade geral de patógenos da saliva de 13 pacientes na TFD após sensibilização com curcumina (5 min) e exposição à luz azul de 450nm (5 min). 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, a redução na contagem bacteriana foi consideravelmente menor (9%) do que no grupo TFD, que teve 68% de declínio bacteriano; mostrando uma redução significativa da população bacteriana apenas no grupo da TFD.

Da mesma forma, Tonon *et al.* (2015), avaliando o efeito da curcumina sozinha e associada à luz azul sobre cepas de *S. mutans* observaram que o uso da curcumina sozinha obteve uma leve redução na contagem desses microrganismos enquanto que quando associada ao LED houve uma redução maior do que 70%.

O presente estudo confirmou também a efetividade do modelo de indução de periodontite por intermédio de ligaduras, mostrando diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao padrão de reparo do osso alveolar na região dos primeiros molares inferiores do grupo CN quando comparado aos grupos em que só houve indução da doença e os grupos de tratamento.

O método utilizado nesse estudo para avaliação da perda óssea, foi a análise morfométrica. Essa metodologia já é bem aceita na literatura, mostrando resultados semelhantes ao encontrados pela histometria; atualmente, a técnica padrão-ouro para avaliação de perda óssea em animal (Fernandes *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011; Çalisir *et al.*, 2016). Isso foi mostrado por Fernandes *et al.*, (2007), onde os autores realizaram um trabalho comparando os dois métodos de avaliação da perda óssea alveolar na doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos. Os resultados mostraram que não houve

diferenças estatísticas entre os dois métodos na detecção da altura óssea. O estudo contribuiu para o entendimento de que o uso de análises morfométricas podem ser uma alternativa por ser mais rápido, mais fácil e mais barato, particularmente quando a proposta é apenas o estudo da perda óssea.

Morfometricamente, tanto a RAR + TFD quanto a RAR sozinha e a curcumina mostraram uma capacidade de redução da perda óssea alveolar, porém sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). 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 sozinha e da curcumina associada ao LED, pode ter apresentado um efeito imunomodulador do processo inflamatório.

Isso já foi mostrado por Carvalho e colaboradores (2011), que afirmaram que a ação da ativação do fotosensibilizador por uma fonte de luz não é apenas sobre os microrganismos, mas também sobre a imunomodulação da resposta inflamatória, constatada pelos autores na redução do número de neutrófilos e da expressão de TNF- α . Lima *et al.* (2004), por sua vez, verificaram a relação direta na produção de TNF- α e a reabsorção do osso alveolar de dentes de ratos com periodontite induzida. A utilização nesse trabalho de um protocolo com curcumina/sacarose a 0,01% talvez possa ter agido como imunomodulador do processo inflamatório e foi capaz de reduzir o padrão de reabsorção óssea alveolar deste modelo de periodontite induzida em ratos, retardando, dessa forma, a evolução da periodontite.

No entanto, a associação da TFD à RAR não mostrou um resultado superior ou benefício adicional ao apresentado pela raspagem e alisamento radicular sozinha. Esse resultado difere de alguns trabalhos já publicados na literatura. Almeida *et al.*, (2007, 2008), no intuito de avaliar a ação da TFD na redução da perda óssea alveolar decorrente de periodontite, demonstraram a ocorrência de menos perda óssea em animais tratados com esse RAR + TFD quando comparados à RAR e ao grupo que recebeu tratamento apenas com o fotosensibilizador (azul de metileno e azul de toluidina), nos períodos de avaliação de 7, 15 e 30 dias.

Da mesma forma, De Oliveira *et al.*, (2016), mostraram uma diferença estatisticamente significantes na perda óssea alveolar favorável para o grupo RAR+TFD quando comparado com a RAR sozinha. E o ganho na porcentagem do tecido ósseo foi maior no grupo RAR + TFD nos 3, 7 e 15 dias de avaliação.

Uma das possíveis razões para o resultado encontrado nesse estudo pode ser o número de episódios de aplicações da TFD utilizado e o tempo de acompanhamento. O presente trabalho utilizou um protocolo fazendo apenas uma única aplicação da TFD após a RAR e um acompanhamento de apenas sete dias. Christodoulides *et al.* (2008) e Chondros *et al.* (2009) num desenho de estudo semelhante em pacientes com periodontite crônica, investigaram o efeito da TFD como adjuvante no tratamento periodontal convencional não cirúrgico. Avaliaram as características clínicas e microbiológicas de 24 pacientes e ambos acharam que não houve melhorias estatisticamente significantes na adição da TFD utilizando um único episódio de aplicação, mas resultou numa diminuição do sangramento à sondagem em comparação com a raspagem e alisamento radicular sozinho.

Lulic *et al.*, (2009), em um estudo clínico com pacientes em fase de manutenção periodontal, revelaram que sessões adicionais de TFD (5 sessões) após terapia não-cirúrgica, forneceram benefícios adicionais nos resultados clínicos em bolsas residuais até 6 meses após a aplicação da terapia, suportando o uso de repetidas doses de TFD. Da mesma forma, Moreira *et al.*, (2015), mostraram que após a aplicação de quatro sessões de TFD associadas a RAR, houve benefícios clínicos, microbiológicos e imunológicos no tratamento de bolsas periodontais profundas em pacientes com periodontite agressiva. Pode-se especular que os efeitos de uma única dose de TFD após a RAR e o acompanhamento de apenas sete dias, como realizado nesse estudo, pode não ser suficiente para contribuir em resultados superiores ao encontrado pelo tratamento padrão-ouro da periodontite, a RAR.

A ausência de um protocolo ideal para uso da TFD torna difícil chegar a uma conclusão definitiva sobre a real eficácia da TFD como coadjuvante à RAR. Embora a TFD traga benefícios adicionais a curto prazo, são necessários mais estudos clínicos, controlados e randomizados que comprovem essa eficácia da TFD como coadjuvante à terapia periodontal não cirúrgica a longo prazo.

O sucesso da TFD é baseado em alguns fatores tais como o tipo, concentração, tempo de pré-irradiação e irradiação do fotosensibilizador, bem como o tipo de fonte de luz e dosagens. O protocolo proposto nesse estudo, utilizando uma solução de curcumina a 0,01%, como agente fotossensível associado a um LED de luz azul, mostrou uma boa efetividade sobre o biofilme dental e no reparo do tecido ósseo, porém mais estudos metodológicos são necessários com a finalidade de avaliar a concentração inibitória mínima da curcumina fotoativada sobre as bactérias do biofilme periodontal, o número de aplicações da terapia, o tempo de fotoativação necessário para máxima ação antimicrobiana da droga, assim como tempo necessário de pré-irradiação da droga sobre o biofilme para que sua máxima

efetividade seja obtida e assim possa elucidar melhor seus efeitos no controle da infecção, permitindo assim sua aplicação na prática clínica de forma mais segura.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se afirmar que:

- I. O protocolo utilizando a concentração de 0,01% e o tempo de fotoativação do corante por 1 minuto, foi suficiente para reduzir efetivamente a contagem bacteriana de *Pg*.
- II. A utilização da curcumina como fotosensibilizador na TFD, mostrou-se eficaz na redução da contagem bacteriana.
- III. Embora a curcumina sozinha e associada à uma fonte de luz, quando utilizada como coadjuvante à RAR, tenha sido eficiente no reparo do tecido ósseo, não mostrou resultados superiores ou sinérgicos quando comparados com a RAR sozinha.

REFERÊNCIAS*

- Abdel Aziz MT, El-Asmar MF, El-Ibrashy IN, Rezaq AM, Al-Malki AL, Wassef MA, Fouad HH, Ahmed HH, Taha FM, Hassouna AA, Morsi HM. Effect of novel water soluble curcumin derivative on experimental type- 1 diabetes mellitus (short term study). *Diabetol Metab Syndr*. 2012 Jul 4; 4(1): 30.
- 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 photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74:656-669.
- 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;332-49.
- Ahn JC, Biswas R, Chung PS. Combination with genistein enhances the efficacy of photodynamic therapy against human anaplastic thyroid cancer cells. *Lasers Surg Med*. 2012 Dec;44(10):840-9.
- Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, Camnitz P, Brodish B, Sibata CH. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers – a review of applications 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.
- 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.
- 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 Nov;79(11):2156-65.
- Al-zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009;80(10):1568-1573.
- 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.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

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

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

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.

Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in dermatology. *Semin. Cutan. Med. Surg* 2008;27:227-238.

Bhatia M, Urolagin SS, Pentyala KB, Urolagin SB, KBM, Bhoi S. Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumina. *J Clin Diagn Res* 2014 Dec;8(12):65-9.

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

Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 9; 59(5): 2056-61.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35(10):877-884.

Çalisir M, Akpınar A, Poyraz O, Göze F, Çınar Z. The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2016 Aug;51(4):499-507.

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.

Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg*. 2011 Nov; 29(11): 735-40.

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

Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4288-95.

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

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

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

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.

Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, *et al*. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chem* 2010;1346–51.

Christersson L, Albin B, Zambon J, Wikesjo U, Genco R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis (I). Light immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* 1987; 58: 529–539.

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

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.

Corrêa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SP, Casarin RCV, Cirano FR, Tenenbaum H, Casati MZ. Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2016;3-9.

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.

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

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.

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.

De Oliveira PG, Silveira e Souza AM, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Messoria, MR, Palioto DB, Grisi, MF, Tedesco AC, de Souza SL. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical, and cytokine evaluation. *Laser Med Sci* 2016 Sep;31(7):1275-83.

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.

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.

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* 2011a;87: 895-903.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS, *et al.* Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg. Med* 2011b;(9):927-34.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, *et al.*, Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med. Mycol.* 2013;51(3):243-251.

Downham, P. Collins, Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J Food Sci. Technol.* 2000;35(1):5-22.

Elburki Ms, Moore DD, Terezakis NG, Zhang Y, Lee HM, Johnson F, Golub LM. A novel chemically modified curcumin reduces inflammation-mediated connective tissue breakdown in a rat model of diabetes: periodontal and systemic effects. *J Periodontal Res* 2016;1-15.

Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies, *Br J Nutr* 2010;(11):1545-57.

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in lidature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2007 Jul-Sep;21(3):216-21.

Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009; 36(3): 219–228.

Fernández-Guarino M, Harto A, Sánchez-Ronco M, García-Morales I, Jaén P. Pulsed dye *laser* vs. photodynamic therapy in the treatment of refractory nail psoriasis: a comparative pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Aug; 23(8): 891-5.

Ferreira JPR. Estudo “in vitro” da ação do laser em baixa intensidade, associado ou não a drogas fotossensibilizadoras, sobre a viabilidade de microrganismos bucais. Marília, 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.

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.

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.

Gomes-Filho JE, Sivieri-Araujo G, Sipert CR, da Silva Santos LM, de Azevedo Queiroz IO, Men Martins, et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016 Mar;13:97-100.

Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res* 2011 Apr;46(2):269-79.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997a; 24: 324–334. 55.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 1997b; 24: 767–776.

Hamblin MR, O’Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol*. 2002 Jan; 75(1): 51-7.

Hamblin MR, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J Infect Dis*. 2003 Jun 1; 187(11): 1717-25.

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

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.

Hong JS, Jung JY, Yoon JY, Suh DH. Acne treatment by methyl aminolevulinate photodynamic therapy with red light vs. intense pulsed light. *Int J Dermatol.* 2013 May;52(5):614-19.

Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs.* 1999 May; 57(5): 725-34.

Hugas SS, Patil S, Metgud R, Nanjwade B, Hugas SM. Influence of application of chlorhexidine gel and curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing: a interventional study. *J Nat Sci Biol Med* 2016 Jul-Dec;7(2):149-54.

Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol.* 2007 Jan; 27(1): 19-35.

Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Food Chem* 2006;(4):720-24.

Jin Kim H, Seung Yoo H, Chul Kim J, Su Park C, Sun Choi M, Kim M, *et al.* Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication, *J Ethnopharmacol* 2009;124(2):189-96.

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

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, Lofgren 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, 79:2021-28.

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

Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, *et al.* Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: a Review of literature. *Int J Mol Sci* 2015 Oct;16(10):24111-26.

- 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.
- Kocher T, Köning J, Hansen P, Rühling A. Subgingival polishing compared to scaling with steel curettes. A clinical pilot study. *J Clin Periodontol* 2001 Feb;28(2):194-9.
- Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72:676-80.
- Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25:487–504
- Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694-04.
- Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol* 2000 1996 Oct;12(1):44-8.
- Lima V, Vidal FD, Rocha FA, Brito GA, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol.* 2004 Jan; 75(1): 162-8.
- Lindhe J, Nyman S, Karring T. Scaling and root planning in shallow pockets. *J Clin Periodontol.* 1984; 9(5): 415-18.
- 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. Tratado de periodontologia clínica. 4ª 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.
- 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.
- Loos B, Claffey N, Egelberg J. Clinical and microbiological effects of root debridement in periodontal furcation pockets. *J Clin Periodontol* 1988: 15: 453–463.
- Lopes BMV, Marcantonio RAC, Thompson GMA, Neves LHM, Theodoro LH Short-term clinical and immunologic effects of scaling and root planing with Er:YAG laser in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79(7): 1158-1167.

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.

Lulic M, Leiggenger GI, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy durinh periodontal maintenance: a proor-of-principle randomized controled clinical trial. J Clin Periodontol 2009 Aug;36(8):661-6

Macedo GO. Efeito da terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico e na terapia periodontal de suporte em diabéticos tipo 2: estudo clínico e laboratorial em humanos [Tese de doutorado]. São Paulo Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2009, 108p.

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.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of gram-negative bacteria: problems and possible solutions. J Photochem Photobiol B 1992;14:262–266.

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

Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistent paterns of *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. J Periodontol 2000 Jan.;71(1):14-21.

Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy as na adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a Split-mouth randomized controlled trial. J Periodontol 2015 Mar;86(3):376-86.

Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Kharazi Fard MJ, Bahador A. Na in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumina-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Lasers Med Sci 2016;7(1):21-5.

Nanashima A, Abo T, Nonaka T, Nonaka Y, Morisaki T, Uehara R, Ohnita K, *et al.* Photodynamic therapy using talaporfin sodium (*laserphyrin*[®]) for bile duct carcinoma: a preliminary clinical trial. Anticancer Res. 2012 Nov; 32(11): 4931-8.

Nyman S, Rosling B, Lindhe J. Effect of profissional 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 RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Junior AB, Taba Junior M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol. 2007; 78(6):965-73.

Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes-Junior AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba-Junior M, *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009 Jan;80(1):98-105.

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.

Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumina and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013 Sep;10(3):313-9.

Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LM, Adabo MD, Lopes T, do Carmo TH, *et al.* Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 2010;25(1):87-91.

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.

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 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.

Quishida CC, Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine[®] and LED light after one and three successive applications, *Lasers Med. Sci.* 2015;30(9):2303-12.

Raghavendra M, Koregol A, Bhola S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J.* 2009 Sep;54 Suppl 1:S102-9

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 curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, 2000 Jul; 7(4):303-8.

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.

Ribeiro MS, Groth EB, Yamada Am, Garcez AS, Suzuki LC, Prates RA, Nunez SC. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. 23° 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.

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.

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 oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa L.*) e curcumina. *Rev Bras Corantes Naturais*, 1992;1(1):158-64.

Santos FA. *et al.* Comparative study on the effect of ultrasonic instruments on the root surface in vivo. *Clin. Oral Invest.* 2008;12:143-50.

Salah M, Samy N, Fadel M. Methylene blue mediated photodynamic therapy for resistant plaque psoriasis. *J Drugs Dermatol.* 2009 Jan; 8(1): 42-9.

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

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

Schwarz F, Sculean A, Berakdar M, Szathmari L, Georg T, Becker J. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008, 35(8):29-44.

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.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Laser Med Sci* 2013a Feb;28(2):669-82.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2013b May;40(5):514-26.

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.

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, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG, Goodson JM. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(4):1391-96.

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.

Souza DM, Prado FA, Prado MA, Rocha RF, Carvalho YR. Avaliação da perda óssea periodontal em ratos por meio dos métodos radiográficos e morfométricos. *Braz J Periodontol* 2011 Sp;21(3):67-73.

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.

Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Kamath V, Barmappa R. Comparative evaluation of the efficacy of curcumina gel with and without photo activation as na adjunct to scalin and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a Split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sci Biol Med* 2015 Aug;6(Suppl 1):S102-9.

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.

Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 1972 Oct; 24(4): 638-44.

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.

Tonnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems, *J Pharm Sci* 1987;76(5):371-73.

Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidorio DM, Bagnato VC, Giusti JS, Santos-Pinto L. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*, *J Contemp Dent Pract* 2015 Jan;16(1):1-6.

Tschen EH, Wong DS, Pariser DM, Dunlap FE, Houlihan A, Ferdon MB. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. *Br J Dermatol.* 2006 Dec; 155(6): 1262-9.

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. Laser* 2007 Out; 1(4):10-22.

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

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.

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

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

Wang HW, Lv T, Zhang LL, Guo MX, Stepp H, Yang K *et al.* Prospective study of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of moderate to severe acne vulgaris in Chinese patients. *J Cutan Med Surg.* 2012 Sep-Oct; 16(5): 324-33.

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

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.

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.

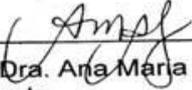
Yamada Jr AM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO* 2004, 52(3):207-210.

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.

Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C. Curcumin onhibits inflammatory response and boné loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand* 2013 Mar; 71(2):349-56.

ANEXO 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa Animal

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o projeto "<u>Avaliação periodontal do efeito da terapia fotodinâmica em animais</u>" (protocolo nº <u>2727-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum / Mirella Lindoso Gomes Campos</u>, 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.</p>	
<p>O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>05 de junho de 2012</u>.</p>	
 _____ Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	Campinas, 05 de junho de 2012.  _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/