



ANA LÍVIA FILETO SANTANA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NA
TERAPIA FOTODINÂMICA APLICADA EM
BIOFILME SUPRAGENGIVAL:**

UMA NOVA ABORDAGEM COMO TRATAMENTO COADJUVANTE
EM PACIENTES ORTODÔNTICOS COM GENGIVITE INDUZIDA
POR PLACA.

Piracicaba, 2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANA LÍVIA FILETO SANTANA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA APLICADA EM BIOFILME SUPRAGENGIVAL:

UMA NOVA ABORDAGEM COMO TRATAMENTO COADJUVANTE
EM PACIENTES ORTODÔNTICOS COM GENGIVITE INDUZIDA
POR PLACA.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum

Este exemplar corresponde a versão final da dissertação defendida por Ana Lívia Fileto Santana e orientada pelo Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum.

Assinatura do Orientador

Piracicaba, 2015

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

Sa59a Santana, Ana Livia Fileto, 1990-
Avaliação dos efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica aplicada em biofilme supragengival : uma nova abordagem como tratamento coadjuvante em pacientes ortodônticos com gengivite induzida por placa / Ana Livia Fileto Santana. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Ortodontia. 2. Periodontia. 3. Gengivas - Doenças. 4. Citocinas. 5. Fotoquimioterapia. 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: Evaluation of the effects of curcumin in photodynamic therapy applied to supragingival biofilm : a approach as adjuvant treatment in orthodontics patients with plaque-induced gingivitis

Palavras-chave em inglês:

Orthodontics
Periodontics
Gingival diseases
Cytokines
Photochemotherapy

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Antonio Wilson Sallum [Orientador]
Mirella Lindoso Gomes Campos
João Sarmiento Pereira Neto

Data de defesa: 06-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 06 de Fevereiro de 2015, considerou a candidata ANA LÍVIA FILETO SANTANA aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Wilson Sallum".

Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mirella Lindoso Gomes Campos".

Profa. Dra. MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "João Sarmiento Pereira Neto".

Prof. Dr. JOÃO SARMENTO PEREIRA NETO

RESUMO

O aumento do biofilme e a ocorrência de gengivite é um achado comum durante o tratamento ortodôntico. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o uso de terapia fotodinâmica (TFD), como coadjuvante ao controle mecânico do biofilme supragengival, tem eficácia no tratamento de pacientes com aparelhos ortodônticos fixos apresentando gengivite, em relação aos parâmetros clínicos e marcadores inflamatórios. Um estudo clínico cego, paralelo, randomizado e controlado foi realizado em pacientes ortodônticos com diagnóstico de gengivite, apresentando sangramento à sondagem em pelo menos um par de incisivos contralaterais e um par de molares ou pré-molares contralaterais (com bráquetes colados). Os pacientes selecionados foram alocados em dois grupos distintos para receber (1) TFD + profilaxia (pTFD; n=12) ou (2) profilaxia (PA; n=12). Nos sítios tratados com pTFD, o sistema incluiu um diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda igual a 450nm, 310mW de potência e 122,04mW/cm² poder de densidade, associado a curcumina 10% como fotossensibilizador. No *baseline*, 1 e 3 meses após, parâmetros clínicos tais como nível de inserção clínica (NIC), profundidade de sondagem (PS), índice gengival (IG), índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS) foram mensurados e o padrão de citocinas [interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-10, IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- α] no fluído gengival crevicular (FGC) foi determinado. Os parâmetros clínicos relacionados a inflamação, como IP e SS reduziram para ambos os grupos ($p < 0,05$), porém sem diferenças estatísticas entre eles ($p > 0,05$). Em relação as citocinas, aos 3 meses, menores concentrações de pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e IL-8 foram encontradas na região anterior das arcadas do grupo pTFD quando comparadas com o grupo que só recebeu profilaxia ($p < 0,05$). Adicionalmente, houve uma redução em IL-8 no grupo teste ao longo do tempo nesta mesma região ($p < 0,05$) e um aumento em IL-1 β na região posterior ao longo do tempo no grupo controle ($p < 0,05$). A TFD como coadjuvante a remoção mecânica do biofilme

demonstrou benefícios imunológicos adicionais em pacientes com gengivite e talvez seja uma importante alternativa durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Ortodontia; periodontia; doenças da gengiva; citocinas; fotoquimioterapia.

ABSTRACT

The increase in the biofilm and gingivitis occurrence are common findings during orthodontic treatment. The aim of the present study was to evaluate the use of photodynamic therapy (PDT), as an adjunct to mechanical control of supragingival biofilm, is effective in treating patients with fixed orthodontic appliances presenting gingivitis in terms of clinical parameters and inflammatory markers. A blind, parallel, randomized, controlled clinical trial was performed in orthodontic patients with gingivitis diagnosis presenting bleeding on probing in at least one pair of contralateral incisors and one more pair of contralateral molars or pre molars (with glued brackets). The selected patients were assigned to receive (1) PDT + prophylaxis (pPDT; n=12) or (2) prophylaxis alone (PA; n=12). In sites treated by pPDT, the laser system included an emitted blue light (LED) of wavelength 450nm, 310mW power and power density 122.04mW/cm², with 10% curcumin as photosensitizer. At baseline, 1 and 3 months after, changes in clinical attachment level (CAL), in probing pocket depth (PPD), gingival index (GI), plaque index (PI), bleeding on probing (BoP) was performed and cytokine levels [interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-10, IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α] in gingival crevicular fluid (GCF) were determined. The clinical parameters related to inflammation, such as PI and BoP reduced for both groups ($p < 0.05$), but no statistical differences between them ($p > 0.05$). Regarding cytokines, at 3-months, lower concentrations of pro-inflammatory IFN- γ , IL-1 β and IL-8 were found in anterior segment of pPDT group compared with PA group ($p < 0.05$). Additionally, there was a reduction in IL-8 for the test group over time in the same part ($p < 0.05$), and an increase in IL-1 β in the posterior segment over time for the control group ($p < 0.05$). PDT as an adjunctive to mechanical biofilm removal demonstrated additional immunological benefits in gingivitis patients and maybe be an alternative therapeutic strategy during orthodontic treatment.

KEYWORDS: Orthodontics; periodontics; gingival diseases; cytokines; photochemotherapy.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Gengivite em pacientes ortodônticos.....	5
2.1.1 Gengivite.....	5
2.1.2 O paciente ortodôntico.....	7
2.1.3 Possibilidades de tratamento.....	11
2.2 Terapia fotodinâmica (TFD).....	15
2.2.1 Histórico.....	15
2.2.2 Mecanismo de ação.....	17
2.2.3 Fonte de luz.....	21
2.2.4 O fotossensibilizador.....	23
2.2.5 TFD em odontologia.....	25
2.2.6 TFD em periodontia.....	28
2.3 Curcumina.....	38

3. PROPOSIÇÃO.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Desenho do estudo.....	47
4.2 Triagem dos indivíduos.....	47
4.3 Protocolos de tratamento.....	48
4.3.1 Profilaxia.....	50
4.3.2 Terapia Fotodinâmica.....	50
4.4 Cálculo amostral.....	52
4.5 Parâmetros clínicos.....	53
4.6 Avaliação do perfil de citocinas.....	53
4.7 Reavaliações.....	54
4.8 Gestão de dados análise estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Parâmetros clínicos.....	57
5.2 Níveis de citocinas.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO 1.....	89

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Maria Aparecida Fileto Santana**, pelo amor incondicional, pela dedicação, carinho e zelo. Por sempre acreditar, ter fé em mim e poder tornar todos os meus sonhos possíveis. Por ser meu maior exemplo, meu porto seguro, meu escudo. Por me fazer acreditar na presença de Deus.

Ao meu pai, **Carlos Roberto Santana**, meu maior exemplo de honestidade, de amor, dedicação e perseverança. Por me emprestar um pouco da sua personalidade, o que com certeza fez com que eu chegasse até aqui hoje.

Ao meu irmão, **Arthur Fileto Santana**, com quem não saberia viver sem. Pelo companheirismo, pelo carinho, pelo amor!

AGRADECIMENTOS

À DEUS

À **Deus**, que em sua infinita bondade, traçou os meus caminhos e me permitiu estar aqui hoje. Agradeço ainda pelo dom da vida por Ele me concedido, pelos obstáculos superados, objetivos alcançados e pela concretização deste sonho.

À **Maria**, Sua mãe, que sempre esteve a minha frente, desatando meus nós, e de todos aqueles que me rodeiam.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

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

À **Coordenadoria Geral de Pós Graduação da FOP/UNICAMP**, em nome da Prof, Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, por toda a atenção dispensada.

À **Coordenadora de Pós Graduação em Clínica Odontológica** Prof. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz.

Às funcionárias da área de Periodontia, **Regina Caetano e Mariana**, que com muito carinho, atenção e paciência, estiveram sempre prontas para ajudar no que fosse preciso.

À **CAPES**, órgão de fomento que concedeu bolsa, em apoio a realização deste estudo.

AOS MESTRES

Ao **Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum**, por acreditar em meu sonho e permitir ser sua orientada, pelos ensinamentos, pelas experiências compartilhadas, pela confiança em mim depositada, pelos cuidados e pela atenção, por nunca me deixar desistir e sempre me incentivar a chegar mais alto.

Aos professores da área de Periodontia desta universidade, **Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior, Prof. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati**, pelos grandes ensinamentos e pelo conhecimento compartilhado.

Aos membros da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati, Prof. Dra. Vânia Célia Vieira de Siqueira, Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, e Prof. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz**, pela atenção e conhecimento dispensados nessa etapa tão importante no aprimoramento deste trabalho.

Às **Prof. Dra. Daiane Cristina Peruzzo e Prof. Dra. Maria Beatriz Borges de Araújo Magnani**, pela prontidão em aceitar fazer parte desta banca de defesa, como suplentes.

Ao **Prof. Dr. João Sarmento Pereira Neto**, pessoa fundamental neste estudo, pelos auxílios prestados durante a triagem dos pacientes na Área de Ortodontia (Departamento de Odontologia Infantil), e ainda por aceitar participar desta banca de defesa.

À **Prof. Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos**, pela orientação durante a graduação, passo fundamental para o acontecimento de hoje. Por permitir que todos os ensinamentos se transformassem em uma enorme amizade. A quem devo muito pelas experiências compartilhadas, pelo incentivo e credibilidade dentro da minha carreira acadêmica. Por aceitar estar aqui, fazendo parte deste momento tão especial. Obrigada Mi.

Ao **Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin**, pela grande colaboração neste projeto, por meio das análises imunológicas.

AOS AMIGOS

À **Viviane Santana Barbosa**, minha parceira de linha de pesquisa, mas acima de tudo, minha amiga. Obrigada por estar todos os dias ao meu lado durante esse árduo projeto, pelos ensinamentos, por toda a ajuda, e principalmente, por vencer esse desafio comigo.

Ao meu colega de pós graduação, **João Paulo Sangiorgio**, pela realização da análise estatística dos dados.

Aos meus amigos de especialização **Cyro Guardiola, Fernanda Felix, Jéssica Pignatti, João Paulo Sangiorgio, Juliana Santos, Mabelle Monteiro, Manuela Rocha, Marília Cabral, Marcela Di Moura, Ricardo Kenji e Stephanie Botti**, pelos momentos de aprendizagem juntos, pela experiência em prática clínica adquirida, pelos momentos de diversão e confraternização.

Aos meus amigos de pós graduação **Ana Regina Moreira, Camila Camarinha, Isabella França, Guilherme, João Paulo Sangiorgio, Lucas Moura, Lucas Queiróz, Mabelle Monteiro, Mayra Albiero, Marcela Di Moura, Maria Alice Palma, Mércia Cunha, Miki Saito, Tiago Taiete e Tiago Tarbes**, pelo companheirismo nesta jornada. E àqueles que acabaram de chegar, **Amanda de Almeida, Elis dos Santos, Fernanda Felix, Manuela Rocha, Rafaela Videira, Rahyza de Assis e Tiago Bueno**, sejam todos muito bem vindos.

Aos meus amigos **voluntários**, que aceitaram participar desta pesquisa, que desprenderam tempo para estarem presentes nas consultas, pela prontidão e paciência. Parte fundamental para os achados aqui apresentados.

Às companheiras de todas as horas **Marcela Di Moura** e **Manuela Rocha**, pela amizade, pela paciência, pelo companheirismo, pela oportunidade de dividir um lar com vocês e, principalmente, por me aguentarem.

Às queridas **Mabelle Monteiro** e **Isabella França**, por fazerem da minha pós graduação um momento mais feliz.

À amiga **Juliana Santos**, pelos conselhos dados, pela amizade, pela confiança.

Às eternas amigas **Erika Sana**, **Carolina Gimenes** e **Patrícia Vilas Boas**, por sempre estarem ao meu lado. Por superarem as distâncias e acreditarem sempre na nossa amizade.

À querida **Flávia Viu**, por compartilhar comigo sempre toda sua alegria. Já provamos que a nossa amizade está muito além da graduação.

À todos os meus **colegas e amigos da graduação, e da pós graduação** pelos momentos já vividos e por todos aqueles que ainda estão por vim.

À querida cidade **de Piracicaba**, por ter me acolhido há 6 anos atrás, e por ter me proporcionado muitos dos momentos mais importantes da minha vida desde então.

AO AMOR

Ao meu namorado, **Marcos Mazzonetto**, pelo sentimento e todos os momentos, bons, e ruins que compartilhamos. Por estar ao meu lado sempre. Pelas ajudas diretas e indiretas neste trabalho. Por me fazer acreditar que, sim, é possível amar e ser amado.

Aos seus pais, **Ivete Ducatti Mazzonetto** e **Antonio Fernando Mazonetto**, e sua irmã **Juliana Mazzonetto**, por me receberem tão bem, sendo uma segunda família para mim. Minha família piracicabana.

À FAMÍLIA

Aos meus pais, **Carlos Santana e Maria Aparecida Fileto Santana**, e meu irmão, **Arthur Fileto Santana**, a quem dedico todo este trabalho. Pelo amor incondicional. Vocês são a razão mais plena de eu estar aqui hoje. Muito Obrigada. Amo vocês.

À minha madrinha, **Leonice Bená Cineis** e à minha tia **Maria Donizette Santana**, mulheres maravilhosas, grandes exemplos para mim, que nunca duvidaram do meu potencial, sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Hoje também estou aqui por vocês.

A todos os **meus tios e primos** que contribuíram direta ou indiretamente para que esse sonho se concretizasse.

A todos àqueles que também fazem parte da minha família, **padrinhos, tios e primos do coração**.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de ação da TFD.....	19
Figura 2. Reações do tipo I e do tipo II na TFD.....	20
Figura 3. Visualização do espectro eletromagnético.....	23
Figura 4. Fluxograma do estudo.....	49
Figura 5. Linha do tempo de execução das terapias propostas.....	51
Figura 6. Sequência de aplicação da TFD.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos pacientes no <i>baseline</i>	57
Tabela 2. Porcentagens (médias $\pm$ DP) de IP, IG e SS, para a boca toda no <i>baseline</i>	58
Tabela 3. Médias (mm $\pm$ DP) de PS e médias (% $\pm$ DP) de IP, IG e SS no <i>baseline</i> , 1 e 3 meses após, em geral e por região anterior ou posterior.....	59
Tabela 4. Médias ($\pm$ DP) das concentrações (pg/ml) dos mediadores para ambos os grupos no <i>baseline</i> , 1 e 3 meses após.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGaAl	-	Arsenieto de gálio e alumínio
°C	-	Graus centígrados
C ₃ H ₉ N	-	Cloridrato de acridina
Cr	-	<i>Campylobactor rectus</i>
CUR	-	Curcumina 10%
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
D ₂ O	-	Oxigênio e deutério
DP	-	Desvio padrão
DU	-	Debridamento ultrassônico
FGC/GCF	-	Fluído gengival crevicular
FGF2	-	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FS	-	Fotossensibilizador
GM-CSF	-	Fatores estimulantes de colônias de granulócitos-macrófagos
g.mol	-	Gramas por molar
He-Ne	-	Hélio-Neônio
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
IFN γ	-	Interferon γ
IG/GI	-	Índice gengival
IL-	-	Interleucina
InGaAlP	-	Fosfeto de índio-gálio-alumínio

IP/PI	-	Índice de placa
J	-	Joule
J/cm ²	-	Joules por centímetro quadrado
LED	-	Diodo emissor de luz
LPS	-	Lipopolissacarídeos
MET	-	Micrografia eletrônica de transmissão
mg/l	-	Miligramas por litro
mg/ml	-	Miligramas por mililitro
µg	-	Microgramas
µl	-	Microlitros
MMP13	-	Matrix metalopeptidase 13
µs	-	Microsegundos
mW	-	Miliwatts
mW/cm ²	-	Miliwatts por centímetro quadrado
NIC/CAL	-	Nível de inserção clínica
nm	-	Nanômetros
O ₂	-	Oxigênio
¹ O ₂	-	Oxigênio singleto
OPG	-	Osteoprotegerina
PA	-	Profilaxia
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	-	Reação de polimerase em cadeia em tempo real

Pi	-	<i>Prevotella intermedia</i>
pg/ml	-	Picograma por mililitro
Pg	-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Pn	-	<i>Prevotella nigrescens</i>
pTFD/PDT	-	Terapia fotodinâmica associada a profilaxia
PS/PPD	-	Profundidade de sondagem
RANKL	-	Receptor ativador nuclear kappa ligante
RAR	-	Raspagem e alisamento radicular
RCT	-	Estudo clínico randomizado e controlado
RNK	-	Receptor ativador nuclear kappa
Seg	-	Segundos
Sm	-	<i>Streptococcus mutans</i>
SS/BoP	-	Sangramento à sondagem
TFD/PDT	-	Terapia fotodinâmica
TI	-	Tempo de irradiação
Tn	-	<i>Tannerella forsythia</i>
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral
TPI	-	Tempo de pré-irradiação
UFC	-	Unidade formadora de colônia
Vs.	-	<i>Versus</i>
W	-	Watts
W/cm ²	-	Watts por centímetro quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

A α	-	Alfa
B β	-	Beta
δ	-	Delta
γ	-	Gama
μ	-	Micro

1. INTRODUÇÃO

Está bem estabelecido que a presença de uma microflora patogênica no biofilme é o fator etiológico primário no desenvolvimento das doenças periodontais (Socransky e Haffajee, 1992). Assim, o principal objetivo durante a terapia periodontal é o rompimento e remoção do biofilme, juntamente com o restabelecimento da homeostase entre a resposta imune do hospedeiro e a comunidade polimicrobiana do biofilme. O termo doença periodontal descreve ainda diferentes quadros clínicos que afetam o periodonto (Pion *et al.*, 2006), podendo ser divididos em duas categorias principais: as gengivites e as periodontites. A gengivite representa uma forma moderada da doença periodontal e não está associada à perda de tecidos periodontais de inserção, sendo um achado universal nas várias populações (Armitage, 1999). A presença de inflamação gengival aumenta o crescimento do biofilme (van Gastel *et al.*, 2008) e, adicionalmente, fatores tais como as características de uma superfície podem influenciar a quantidade e a qualidade do biofilme a ser removido da superfície dentária, como é possível observar em pacientes ortodônticos (Bernimoulin, 2003).

O tratamento ortodôntico com componentes fixos é utilizado amplamente na resolução de diversas más oclusões, porém seus acessórios (bandas, bráquetes, arcos, elásticos, molas, entre outros) aumentam potencialmente o número de áreas de retenção de biofilme dentária e, conseqüentemente, dificultam a higiene bucal, particularmente nos segmentos posteriores da boca, dado o seu difícil acesso (van Gastel *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012; Ireland *et al.*, 2014). Durante a terapia ortodôntica, os ortodontistas são frequentemente confrontados com gengivite generalizada em seus pacientes (Sallum *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012). Alguns estudos sugerem ainda que aumentos gerais nos níveis ou proporções de bactérias anaeróbias patogênicas podem ocorrer dentro de biofilme supra ou subgengival durante o tratamento (van Gastel *et al.*, 2008; Ireland *et al.*, 2014). Além disso, o aumento gengival tem sido relatado após a colocação de aparelhos e poderia explicar o aumento da profundidade de sondagem durante o

tratamento ortodôntico (Sallum *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2014), principalmente no segmento anterior (Ristic *et al.*, 2008). Outras mudanças foram perceptíveis por meio dos diversos parâmetros periodontais, como índice de placa (IP), índice gengival (IG), sangramento à sondagem (SS), recessão gengival e nível clínico de inserção (NIC) (Sallum *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2006; van Gastel *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012). Estudos também demonstraram níveis elevados de mediadores inflamatórios tais como as citocinas nos pacientes ortodônticos (Başaran *et al.*, 2006; van Gastel *et al.*, 2008; van Gastel *et al.*, 2011).

Aparentemente, as reações gengivais em pacientes ortodônticos são transitórias, não representando danos permanentes aos tecidos periodontais, entrando, assim, em remissão após a remoção dos componentes fixos (van Gastel *et al.*, 2008; Sallum *et al.*, 2004; Ristic *et al.*, 2008). Todavia, sabe-se que presença de biofilme nos sítios de retenção aumentam significativamente o risco para periodontite (Naranjo *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2014). A fim de driblar essa situação, algumas terapias têm sido propostas como coadjuvantes para controle mecânico do biofilme supragengival por meio de agentes químicos, tais como anti-sépticos, sendo a clorexidina a mais eficaz (Hass *et al.*, 2014). No entanto, a adesão ao tratamento pode não ser ideal em muitos pacientes já que o uso a longo prazo desta substância é conhecido por manchar os dentes e língua, afetando a sensação de gosto, entre outras reações adversas (Ren *et al.*, 2014). Devido às dificuldades associadas ao controle do biofilme dentário supragengival e da gengivite, uma nova abordagem pode ser proposta, como a terapia fotodinâmica (TFD).

A TFD consiste na associação de um fotossensibilizador (FS) 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). Esta, além de eliminar bactérias, tem ação também sobre fungos, vírus e protozoários (Wainwright e Crossley, 2004).

O uso da TFD para inativar microorganismos foi demonstrado pela primeira vez há mais de 100 anos, quando Oscar Raab relatou o efeito letal de cloridrato de acridina e luz visível sobre *Paramecium caudatum* (Raab, 1900). A TFD consiste no uso de um fotossensibilizador, que pode ser do tipo corante tricíclico com diferentes átomos centrais (Ex: azul de toluidina, eosina, riboflavina), tetrapirrólicos (Ex: porfirinas e derivados) e furocumarinas (Ex: psoralen e derivados) em conjunto com uma luz visível, geralmente do tipo laser de baixa intensidade. As moléculas do fotossensibilizador excitadas pela luz transferem energia para o oxigênio, criando uma forma de oxigênio hiperreativa e tóxica, denominada de oxigênio singleto, capaz de reagir com sistemas vivos, destruindo-os (Carvalho et al., 2011) (fotoproceto Tipo II) ou interação com outras moléculas como receptores de elétrons resultando na produção de hidroxila e outros radicais orgânicos (fotoproceto Tipo I). Portanto, a TFD torna-se um método viável para destruição bacteriana sem, todavia, causar resistência microbiana como os antimicrobianos convencionais (Macrobert et al., 1989), ou ainda efeitos clínicos indesejáveis como comparando com a clorexidina (Soukos e Goodson, 2011).

Recentemente, a ação antimicrobiana dos lasers/LED tem sido estudada nas mais diversas áreas da Odontologia. Os efeitos destes nos diferentes tecidos estão intimamente relacionados com a distribuição da energia depositada, de modo que a propriedade óptica de cada tecido influencia e determina a extensão e a natureza da resposta tecidual a qual ocorre através dos processos de absorção, transmissão, reflexão e difusão da luz laser (Pinheiro, 1998).

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

via oral ou ainda topicamente (Abe *et al.*, 1999; Ramsewak *et al.*, 2000; Literat *et al.*, 2001; Martins, 2009).

A curcumina é um pigmento natural, fenólico, com cor amarela intensa, isolada a partir de raízes da planta *Curcuma longa* (Epstein *et al.*, 2010). É um constituinte do tempero açafrão, e está em uso em todo o mundo como um tempero de cozinha, aromatizantes e corantes. Alguns estudos têm proposto que os efeitos terapêuticos da curcumina podem, eventualmente, ser aumentados por combinação com a luz (Bruzell *et al.*, 2005; Dujic *et al.*, 2009), assim atraindo pesquisadores para explorar a sua utilização em diversas áreas, incluindo Fotoquímica e Fotobiologia. Um número de estudos considerável concentrou-se na farmacocinética, segurança e eficácia da utilização da curcumina, em seres humanos. Além disso, a fotossensibilização de alguns microrganismos bucais pela curcumina já tem sido investigada. (Haukvik *et al.*, 2011; Hegge *et al.*, 2011). A curcumina tem mostrado ainda vantagens econômicas, considerando o baixo custo, o simples manuseio e a boa efetividade (Gupta *et al.*, 2013).

A eficácia da ação da TFD sobre os parâmetros clínicos e marcadores inflamatórios tem sido investigado utilizando diversos FS (Soukos e Goodson, 2011). Porém, ainda não existe um consenso na literatura sobre um protocolo de utilização do laser, do comprimento de onda da luz adequado, tipo de agente FS e frequência de fotossensibilização sendo, portanto, de suma importância essa investigação, bem como seu resultado nos tecidos periodontais e nos periodontopatógenos. As evidências relacionadas ao uso de TFD associada a curcumina em pacientes com gengivite, para o controle do biofilme supragengival em pacientes durante o tratamento ortodôntico ainda é extremamente limitada. Assim, o presente estudo clínico randomizado controlado foi realizado no intuito de avaliar se o uso coadjuvante da TFD ao controle mecânico do biofilme supragengival tem eficácia no tratamento de pacientes com gengivite relacionada ao uso de aparelhos ortodônticos fixos, em termos de parâmetros clínicos e imunológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gengivite em pacientes ortodônticos

2.1.1 Gengivite

A presença de uma microflora patogênica no biofilme é o fator etiológico primário no desenvolvimento das doenças periodontais (Socransky e Haffajee, 1992). Imediatamente após a erupção de um dente, o biofilme bacteriano começa a formar-se nas superfícies dentárias expostas à cavidade bucal e em contato íntimo com a margem gengival (Botero *et al.*, 2015). Assim, o principal objetivo durante toda e qualquer terapia periodontal é o rompimento e remoção do biofilme, bem como a restauração da homeostase entre a resposta imune do hospedeiro e a comunidade microbiana presente no biofilme.

A gravidade da doença periodontal depende do nível de acúmulo de biofilme, da virulência das bactérias presentes neste, bem como das respostas imunes celular e humoral ao microbioma do biofilme (Botero *et al.*, 2015). A gengivite representa uma forma moderada da doença periodontal e não está associada à perda de tecidos periodontais de inserção, sendo praticamente um achado universal em várias populações, incluindo crianças e adolescentes (Armitage, 1999; Botero *et al.*, 2015).

A forma mais comum de desenvolvimento da gengivite está relacionada ao acúmulo de biofilme adjacente à margem gengival (Löe *et al.*, 1965). Esse acúmulo resulta em mudanças indiretas no tecido gengival, podendo ser definidas em fases distintas (Page e Schroeder, 1976). A primeira fase é caracterizada como uma resposta inflamatória aguda dominada por neutrófilos, seguida pelo acúmulo de linfócitos T em sítios inflamatórios, juntamente com mudanças no padrão de homeostase do colágeno e exacerbação do perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias. Após isto, a cronicidade do dano relacionado ao biofilme leva a uma

inflamação crônica que consiste em componentes da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro.

Estes processos inflamatórios os quais ocorrem durante os primeiros dias decorridos do acúmulo de biofilme são pouco evidentes clinicamente. Os sinais clínicos inflamatórios gengivais se tornam mais aparentes em estágios mais avançados, e incluem vermelhidão e edema do tecido gengival, sangramento à sondagem, mudanças no contorno e na consistência, além de um aumento significativo no fluxo de fluído gengival crevicular (FGC) (AAP, 2000).

A gengivite em indivíduos jovens normalmente permanece crônica durante um período de tempo prolongado, sem causar qualquer dano para o ligamento periodontal ou osso adjacente. No entanto, uma alteração do equilíbrio entre o biofilme e o hospedeiro pode dar origem a formas mais graves da doença periodontal, tais como as periodontites (Burt *et al.*, 2005; Botero *et al.*, 2015). Disbiose microbiana, crescimento excessivo de bactérias patogênicas, perturbação do sistema imunológico e fatores de susceptibilidade adquiridos ou genéticos são, provavelmente, os fatores envolvidos na progressão da doença de gengivite para periodontite (Contreras e Slots, 1996; Offenbacher *et al.*, 2007; Darveau, 2010). Assim, a prevenção e o tratamento da gengivite, nos indivíduos ou ainda na população como um todo, é considerada um dos primeiros passos na intenção de prevenir as periodontites.

Um importante estudo de âmbito nacional realizado em 2010, estimou que entre os indivíduos de 15 a 19 anos de idade, utilizando o Índice Periodontal Comunitário como parâmetro, aproximadamente 50,9% apresentaram saúde gengival, porém a presença de cálculo supragengival foi a alteração mais presente neste grupo etário (28,4%). Cerca de 9% dos adolescentes apresentavam bolsas rasas e 0,7%, bolsas profundas, como pior condição periodontal, sendo a região Norte a que identificou maior percentual de adolescentes com essas alterações (19,6%, sendo 17,9% com bolsas rasas e 1,7% com bolsas profundas). Foi também na região Norte que se registraram as piores condições periodontais deste grupo

etário, em que apenas 30,8% dos adolescentes dessa região apresentaram sextantes hígidos. As melhores condições foram observadas na região Sudeste, com 56,8% dos examinados apresentando sextantes hígidos. (Ministério da Saúde - Projeto SB Brasil, 2010). Botero *et al.* (2015), através de uma revisão da literatura, relataram ainda que as doenças periodontais inflamatórias são prevalentes em crianças e adolescentes em toda a América Latina, sendo que a gengivite em si afeta aproximadamente 34,7% dos indivíduos jovens latino- americanos, com as maiores prevalências encontradas na Colômbia (77%) e Bolívia (73%). Assim, a gengivite precisa ser identificada e tratada em indivíduos jovens, uma vez que, mesmo de maneira controversa, representa um risco para desenvolvimento da periodontite nestes indivíduos (Schätzle *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2009).

2.1.2 O paciente ortodôntico

O tratamento ortodôntico com componentes fixos é utilizado amplamente na resolução de diversas más oclusões, porém durante a terapia ortodôntica, os ortodontistas são frequentemente confrontados com gengivite generalizada em seus pacientes (Sallum *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012). Assim, quase todos os pacientes ortodônticos experimentam algum grau de inflamação dos tecidos moles (Ren *et al.*, 2014).

A colocação de um aparelho ortodôntico consiste ainda na criação de superfícies com diferentes propriedades, alheias àquelas presentes nos tecidos duros e moles da cavidade bucal (Ren *et al.*, 2014).

Dentes bandados induzem uma maior formação de biofilme e, conseqüentemente, uma exacerbação da inflamação gengival do que aqueles com bráquetes colados, principalmente na margem gengival ou ainda quando a banda localiza-se subgengivalmente delimitada (Demling *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2012).

Os diferentes tipos de bráquetes, bem como a localização destes também parecem influenciar no acúmulo de biofilme. Segundo van Gastel *et al.* (2007) e van

Gastel *et al.* (2009), diferentes desenhos de bráquetes podem ter um impacto significativo sobre a carga bacteriana e os parâmetros periodontais. Lindel *et al.* (2011) constataram que bráquetes de cerâmica apresentam um menor acúmulo de biofilme quando comparados aos metálicos. Já Baka *et al.* (2013) não encontraram diferenças significantes entre bráquetes autoligáveis e convencionais ligados com ligadura de aço inoxidável, quanto a retenção de biofilme dentário, refletindo então uma dificuldade em se obter um consenso.

A escolha do método de fixação do arco de aço também é capaz de interferir na quantidade de biofilme futura ao redor dos bráquetes, sendo os dois métodos mais comuns os anéis elásticos e às ligaduras de aço. Os anéis elásticos foram associados não só com um alto acúmulo de biofilme e quantidade de sangramento, quando comparados as ligaduras de aço, mas também a um maior número de periodontopatógenos (Souza *et al.*, 2008).

Quanto a localização, bráquetes colados nas faces vestibulares na maxila acumularam mais biofilme, quando comparados aos colados nas faces linguais da mandíbula (van der Veen *et al.*, 2010). Lombardo *et al.* (2013) concluiu também que aparelhos ortodônticos vestibulares e linguais apresentam diferentes potenciais de modificação nos parâmetros clínicos, sendo que indivíduos os quais utilizaram aparelhos linguais apresentavam uma maior retenção de biofilme em 4 e 8 semanas após a colagem do aparelho, em conjunto a um aumento na inflamação gengival e na contagem de bactérias da espécie *S. mutans*.

O biofilme é capaz ainda de se depositar em dispositivos de ancoragem temporária, tais como mini-parafusos, micro-implantes, ou mini-placas, podendo causar inflamação dos tecidos moles adjacentes, semelhantes às mucosites e peri-implantites, especialmente nas porções transgengivais dos dispositivos. Esses episódios inflamatórios então associados a um aumento de 30% na taxa de falha dos dispositivos (Miyawaki *et al.*, 2003).

As mudanças clínicas são perceptíveis por meio dos diversos parâmetros periodontais, como índice de placa (IP), índice gengival (IG), sangramento à sondagem (SS), recessão gengival e nível clínico de inserção (NIC) (Huser *et al.*, 1990; Sallum *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2006; van Gastel *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012). A exemplo disto, o aumento gengival tem sido relatado após a colocação aparelhos fixos, o que poderia explicar o aumento da PS durante o tratamento ortodôntico (Sallum *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2014), principalmente no segmento anterior (Ristic *et al.*, 2008).

Corroborando os danos causados por aparelhos ortodônticos para o periodonto, Sallum *et al.* (2004) observaram significativas reduções na quantidade de biofilme, de gengivite, da PS e na presença de microrganismos periodontopatogênicos corridos 30 dias após a remoção do aparelho ortodôntico e da realização de profilaxia por um profissional.

Huser *et al.* (1990) realizaram um estudo de boca dividida, o qual avaliou os efeitos clínicos e microbiológicos da instalação de bandas ortodônticas em 10 pacientes. Eles avaliaram quatro sítios por paciente; dois deles compunham o grupo teste, sendo dentes bandados e os outros dois compunham o grupo controle, sendo dentes não bandados. Os parâmetros foram avaliados no início do estudo, 5, 7, 47, 72 e 90 dias após a colocação de aparelhos ortodônticos. Os resultados mostraram aumentos nos IP, de IG e espiroquetas, acompanhados de uma diminuição nos níveis de cocos nos sítios testes em comparação com os sítios controles, enquanto a PS permaneceu inalterada para ambos os grupos.

Avaliações das alterações clínicas e microbiológicas foram realizadas por Naranjo *et al.* (2006) em 30 pacientes antes e 3 meses após a colocação do aparelho ortodôntico (teste), e 30 pacientes sem aparelho (controle). Os resultados revelaram profundidade de sondagem e nível de inserção clínica inalterados após 3 meses, porém houve um aumento na quantidade de biofilme e nos sinais clínicos de inflamação gengival, além de um aumento dos patógenos periodontais, tais como Pg, Pi, Pn, Tf e espécies *Fusobacterium*.

Resultados microbiológicos semelhantes ainda foram encontrados em outro estudo (Kim *et al.*, 2012) o qual avaliou a microbiota subgengival antes da colocação do aparelho ortodôntico, e 3 e 6 meses após a mesma, bem como durante a fase de nivelamento e alinhamento ortodôntico, por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR), numa amostra composta por 30 pacientes. Os resultados mostraram um aumento significativo na frequência de Tf, Pn e Cr após a colocação dos componentes do aparelho, com destaque na região de molares.

Com tempos de acompanhamento e metodologias semelhantes, Ristic *et al.* (2008), avaliaram por meio de um estudo prospectivo 32 adolescentes, entre 12 e 18 anos de idade, antes da colocação do aparelho, 1, 3 e 6 meses após, na intenção de detectar mudanças na microflora periodontopatogênica anaeróbia e os efeitos clínicos periodontais. Os valores de PS, número total de microrganismos e número de pacientes com achados positivos para Pi, dentre outros periodontopatógenos aumentaram ao máximo até 3 meses, quando comparados com o período antes do início do tratamento, sendo que ambos os valores decresceram 6 meses após, confirmando a transitoriedade desta condição. Adicionalmente, observou-se um aumento na PS, principalmente no segmento anterior, indicando que todas as reações durante o tratamento ortodôntico fixo são consequências da reação gengival em si, e não resultados da deterioração dos tecidos periodontais mais profundos.

Estudos também demonstraram níveis elevados de mediadores inflamatórios tais como as citocinas nos pacientes ortodônticos (Başaran *et al.*, 2006; van Gastel *et al.*, 2008; van Gastel *et al.*, 2011). Diferentes fases do tratamento ortodôntico foram avaliadas por Başaran *et al.* (2006) em 15 adolescentes, comparando biomarcadores antes e após a colocação do aparelho ortodôntico fixo. Tanto as fases de nivelamento e distalização aumentaram o volume e a concentração de interleucinas 2, 6 e 8 nos tecidos periodontais, por meio da análise do FGC. É possível discernir então que os níveis de biomarcadores no FGC podem estar intimamente relacionados com a inflamação decorrente do acúmulo de biofilme,

bem como com os eventos associados à movimentação dentária em si, podendo haver ainda uma potencialização dos efeitos clínicos, quando em conjunto. Adicionalmente, as concentrações de citocinas antes do tratamento ortodôntico, tais como as interleucinas 6 e 8, parecem apresentar um importante fator preditivo para alguns potenciais parâmetros inflamatórios durante o tratamento (van Gastel *et al.*, 2011).

2.1.3 Possibilidades de tratamento

No modelo experimental clássico de gengivite experimental em humanos, Løe *et al.* (1965) descobriram que a eliminação de depósitos de biofilme das superfícies dentárias e, conseqüentemente, a criação de superfícies limpas por tempos mais prolongados como resultado de uma meticulosa higiene bucal, conduz a erradicação dos sinais clínicos da gengivite. Estes dados têm o potencial de validar o papel fundamental do biofilme no desenvolvimento da gengivite.

Conseqüentemente, a maioria das modalidades de tratamento mais comuns para gengivite consistem em debridamento mecânico do biofilme e instruções adequadas em relação as práticas de higiene. Sua eficácia no controle do biofilme supragengival e da gengivite tem sido amplamente demonstrado. No entanto, há relatos de que o controle por si só pode não ser suficiente para prevenir o aparecimento ou a recorrência da doença periodontal em uma grande porção da população (Serrano *et al.*, 2014). Diferentes explicações têm sido defendidas para justificar este fato, incluindo: Limitações em relação ao tempo de escovação; uso limitado de métodos para limpeza interdental; tendência ao retorno dos níveis basais de biofilme em pacientes instruídos em relação aos procedimentos adequados de higiene bucal e, diferentes composições do biofilme dentário (Serrano *et al.*, 2014).

Como pode ser visto, os pacientes ortodônticos experimentam aumentos no acúmulo de biofilme supragengival, resultando em uma pior condição periodontal após a colocação dos componentes dos aparelhos fixos (Hass *et al.*, 2014). Aparentemente, as reações gengivais em pacientes ortodônticos são

transitórias, não representando danos permanentes aos tecidos periodontais, entrando assim em remissão após a remoção dos componentes fixos (Sallum *et al.*, 2004; van Gastel *et al.*, 2008; Ristic *et al.*, 2008). Todavia, sabe-se que presença de biofilme nos sítios de retenção aumentam significativamente o risco para periodontite (Naranjo *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2014). Claramente, este é o resultado de uma eficácia limitada do controle mecânico do biofilme em decorrência aos efeitos retentivos adicionais.

Escovas manuais com conformações especiais para pacientes ortodônticos parecem ser mais eficientes que as convencionais, com cerdas planas (Rafe *et al.*, 2006). Escovas elétricas também têm sido aceitas, com relação a uma melhor performance, quando comparadas a escovação manual (Schätzle *et al.*, 2010). Ainda assim, indivíduos com aparelhos ortodônticos fixos compõe um grupo de pacientes que podem ser beneficiados com o uso de terapias coadjuvantes ao controle mecânico do biofilme supragengival.

Algumas terapias têm sido propostas tais como, a incorporação de agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios em pastas, bochechos, vernizes, adesivos, géis, dentre outras apresentações (Ren *et al.*, 2014), ou ainda a administração de anti-inflamatórios sistêmicos (Polak *et al.*, 2014).

A clorexidina ainda permanece como o antimicrobiano mais efetivo na redução de complicações relacionadas ao biofilme em pacientes ortodônticos (Ren *et al.*, 2014), assumindo a posição de um dos mais estudados antissépticos, de forma geral. Estudos sugerem diferentes formas de uso para esta substância nesta amostra de pacientes, tais como irrigação subgengival e bochecho, ou ainda diferentes concentrações, como 0,12% e 0,2% (Hass *et al.*, 2014). Porém, o uso dessa substância parece estar relacionado a efeitos adversos associados ao uso a longo prazo desta substância, como manchamento, alteração na sensação de paladar, entre outras reações.

Estudos avaliando outras substâncias antissépticas para uso diário em pacientes ortodônticos têm sido descritos. O cloreto de cetilpiridínio é um antimicrobiano bucal eficaz, porém em muitas das formulações a sua biodisponibilidade é baixa (Ren *et al.*, 2014). Os benefícios dos cremes dentais e dos bochechos contendo fluoretos foram bem estabelecidos, pois além de auxiliar remineralização do esmalte dentário, o flúor age como um tampão para neutralizar os ácidos produzidos por bactérias e suprime o seu crescimento (Busscher *et al.*, 2010). O fluoreto estanhoso fornece benefícios duplos com relação à cárie e prevenção de biofilme por meio dos íons de estanho (Wiegand *et al.*, 2009).

A combinação de um fluoreto de amina a fluoreto estanhoso em pastas de dentes ou bochechos apresentou maior inibição de biofilmes e menos gengivite durante tratamento ortodôntico em comparação a produtos contendo fluoreto de sódio (Ogaard *et al.*, 2006). Porém em outro estudo, o qual avaliou o uso desta mesma substância em relação aos benefícios adicionais a redução de biofilme e de gengivite, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de estudo, decorridos um mês (Madlena *et al.*, 2012).

Pontier *et al.* (1990) investigaram a eficácia de uma lavagem com benzoato de sódio previamente a escovação em um ensaio clínico controlado e randomizado, no qual 16 pacientes ortodônticos (idades entre 11 e 18 anos) receberam os dois tratamentos propostos, tanto teste quanto controle, com um determinado tempo de intervalo. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à quantidade de biofilme e a presença de gengivite ao final de um período de 5 semanas de estudo.

Maiores efeitos relacionados ao uso diário de antissépticos em pacientes ortodônticos podem ser observados com o uso de óleos essenciais (Hass *et al.*, 2014). Tufekci *et al.* (2008) avaliaram a eficácia da utilização de um antisséptico coadjuvante contendo estas substâncias na redução de biofilme e gengivite. Todos os participantes receberam instruções de higiene bucal (escovação e uso do fio dental) no início do tratamento. Um aumento significativo na quantidade de biofilme

e gengivite foi observado no grupo controle após seis meses, ao passo que os níveis destes mesmos parâmetros se mantiveram baixos durante todo o estudo para o grupo teste. Após seis meses, a quantidade de biofilme e gengivite foi aproximadamente 50% menor em pacientes ortodônticos que utilizaram bochechos contendo óleos essenciais, como terapia coadjuvante a remoção mecânica do biofilme. Alves *et al.* (2010) realizaram um estudo clínico randomizado avaliando o uso de antissépticos em 30 indivíduos, entre 12 e 21 anos de idade, os quais utilizavam aparelho ortodôntico fixo. Os resultados deste corroboraram os achados de Tufekci *et al.* (2008).

Uma recente revisão sistemática (Serrano *et al.*, 2014) avaliou diferentes formulações e veículos para agentes químicos específicos em relação à gengivite e ao controle de placa. A variável primária analisada foi inflamação gengival, mensurada por diferentes índices gengivais e de sangramento. Os resultados sugeriram que os bochechos podem promover melhores resultados. Todavia, um formato ideal de via de administração para os agentes químicos parece ser o dentifrício, devido ao fato de ser um item mais comum para a população, em conjunto com a escova dental, reduzindo os custos adicionais em adquirir um outro agente. Porém este veículo também apresenta um número significativo de limitações, incluindo maiores dificuldades em sua formulação, por interagir com outros diferentes ingredientes (Sanz *et al.*, 2013), impossibilidade de atingir outros sítios bucais, tais como amígdalas e faringe, limitações de uso em situações específicas (após cirurgias, condições dolorosas agudas) e o mencionado menor impacto sobre gengivite e índices de placa. Por outro lado, os enxaguatórios podem fornecer acesso a outros nichos bucais e um maior impacto sobre medidas de resultados clínicos. Pode-se especular então que sendo o dentifrício o formato de apresentação ideal para a população em geral, o bochecho poderia ser mais adequado para indivíduos de maior risco ou em situações clínicas específicas, como para os pacientes ortodônticos. Além disso, os efeitos adversos, custos econômicos e a indicação clínica, devem também serem levados em consideração.

Polak *et al.* (2014) verificaram ainda, por meio uma revisão da literatura, o efeito clínico dos agentes anti-inflamatórios em indivíduos com gengivite induzida por placa. Substâncias com propriedades anti-inflamatórias, em particular os anti-inflamatórios não-esteroidais, mostraram efeitos benéficos na resolução de gengivite, quer como uma modalidade de tratamento único ou como terapia coadjuvante. No entanto, esta conclusão baseou-se em estudos limitados, contra indicando assim o uso destes agentes na prática clínica, mesmo em pacientes com capacidade limitada de controle de biofilme, principalmente devido a seus efeitos colaterais. Embora alguns produtos naturais aplicados topicamente como irrigação com extrato de ervas, *spray* de ácido hialurônico, gel de licopeno, vitamina D, extrato de magnólia terem mostrado um efeito benéfico sobre a inflamação gengival, os autores afirmaram a dificuldade em atribuir esse efeito a uma capacidade anti-inflamatória, pois seus mecanismos biológicos são ainda mal definidos.

2.2 Terapia fotodinâmica (TFD)

Diante das dificuldades associadas ao controle do biofilme dental supragengival e da gengivite por meio da remoção mecânica, bem como a falta de um consenso sobre qual terapia coadjuvante utilizar na prática clínica, a TFD figura como um método antimicrobiano promissor.

2.2.1 Histórico

Os primeiros indícios do uso da TFD têm registros de mais de 4000 anos, com os egípcios, utilizando a ingestão de plantas e luz solar para o tratamento de doenças como vitiligo (Ackroyd *et al.*, 2001). Todavia, a técnica ganhou maior impacto e passou a ser praticada com sistemática científica somente no século XX. O uso da TFD para inativar microrganismos foi demonstrado acidentalmente pela primeira vez há mais de 100 anos, quando Oscar Raab, aluno de Hermann von Tappeiner, então diretor do Instituto de Farmacologia da Universidade de Ludwig-Maximilians, em Munique, relatou o efeito letal de cloridrato de acridina ($C_{13}H_9N$) e luz visível sobre culturas de *Paramecium caudatum*, a depender do horário do dia

no qual o experimento era realizado (Raab, 1900). Raab percebeu que esse tipo de protozoário era mais efetivamente inativado quando as soluções eram colocadas próximas às janelas do laboratório e ficavam expostas às luzes que passavam por elas (Soukos e Goodson, 2011). Assim, foram capazes de validar a propriedade óptica de fluorescência e concluir que não era a luz, mas sim alguns produtos da fluorescência que induziam a toxicidade *in vitro*. Após uma sequência de experimentos, os mesmos pesquisadores postularam que tal efeito era resultado da transferência de energia da luz para a substância química. Em uma segunda publicação, von Tappeiner sugeriu ainda que havia um grande potencial de aplicação de substâncias fluorescentes nas diferentes áreas da medicina (Ackroyd *et al.*, 2001).

Em 1900, aconteceu um marco histórico para a TFD ao administrar-se um fotossensibilizador (FS) via parenteral pela primeira vez, utilizando eosina via oral no tratamento de epilepsia. Este importante passo conduziu então a primeira aplicação de um composto fluorescente em conjunto com uma luz, na qual von Tappeiner, com a colaboração do dermatologista Jesionek, utilizaram como recursos um corante, a eosina tópica e a exposição de uma luz branca no tratamento de tumores de pele (Ackroyd *et al.*, 2001).

Adicionalmente, Jodlbauer e von Tappeiner demonstraram ainda a presença de oxigênio nestas reações de fotossensibilização e, em 1907, introduziram de fato o termo Terapia Fotodinâmica, que foi então definido como “o processo de fotossensibilização dependente de oxigênio” (Daniel e Hill, 1991; Ackroyd *et al.*, 2001).

Na década de 60, Lipson, em uma fase pré-clínica, investigou o acúmulo preferencial de hematoporfirina em tumores implantados em camundongos e ratos, observando então que a incidência de luz resultava em regressão da doença. Então, no final daquela mesma década, o pesquisador obteve sucesso no tratamento de uma mulher, portadora de câncer de mama, utilizando de hematoporfirina D e irradiação seletiva do tumor, marcando assim o início da TFD como alternativa

clínica no tratamento de câncer. Já na década de 70, os estudos voltaram-se para o uso desta terapia em microrganismos (Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

A partir dos anos 90, uma vasta gama de estudos evidenciou o potencial desta terapia em outras doenças (Levy, 1995). Nesse âmbito encontram-se a psoríase, para qual resultados promissores foram encontrados; degeneração macular da retina; condições autoimunes; arteriosclerose e estenose; remoção de verrugas da laringe (Ben-Hur *et al.*, 1993); micoses por fungos (Wolf *et al.*, 1994) e destruição de infecções bacterianas resistentes a antibióticoterapia convencional (van der Meulen *et al.*, 1997; Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

Dobson e Wilson utilizaram, à partir de 1992, a TFD em bactérias orais. E finalmente, a partir dos anos 2000, estudos clínicos começaram a ser realizados com o intuito de agir sobre a cárie e biofilmes supra- e subgengivais (Ackroyd *et al.*, 2001; Takasaki *et al.*, 2009).

2.2.2 Mecanismo de ação

A TFD consiste na associação de FS exógeno, uma fonte de luz, e a presença de oxigênio, com o objetivo de provocar a morte bacteriana. (Wilson *et al.*, 1995; Soukos *et al.*, 1996; Dortbudak *et al.*, 2001). Esta, além de eliminar bactérias, tem ação também sobre fungos, vírus e protozoários (Wainwright e Crossley, 2004).

A TFD é baseada em três princípios fotobiológicos, sendo estes (Meisel e Kocher, 2005):

- a) Lei de Grtотthus-Draper: A luz utilizada deve possuir um comprimento de onda adequado para ser absorvida, pois apenas o montante de luz absorvida é que poderá desencadear uma reação fotoquímica do FS.
- b) Lei de Stark-Eisten: Todas as moléculas de FS envolvidas na reação de foto-indução absorvem um quantum de energia emitida pela fonte de luz de escolha.

- c) Lei de Bunsen-Roscoe: O efeito fotoquímico é uma função do produto de intensidade da luz de escolha e do tempo de duração da exposição da luz.

A TFD consiste no uso de um FS, que pode ser do tipo corante tricíclico com diferentes átomos centrais (Ex: azul de toluidina, eosina, riboflavina), tetrapirrólicos (Ex: porfirinas e derivados) e furocumarinas (Ex: psoralen e derivados) em conjunto com uma luz visível, geralmente do tipo laser de baixa intensidade. As moléculas do FS, após terem se ligado as células alvo, excitadas pela absorção de fótons, transferem energia para o oxigênio, criando uma forma de oxigênio hiperreativa e tóxica, denominada de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), ou ainda radicais livres, que também possuem propriedades citotóxicas (Carvalho *et al.*, 2011) (Figura 1). Assim, duas formas distintas de reações podem decorrer do processo de fotossensibilização, sendo pela transferência direta de elétrons entre o corante e as biomoléculas, ou ainda pela transferência de energia, pela excitação do corante, resultando na formação de $^1\text{O}_2$.

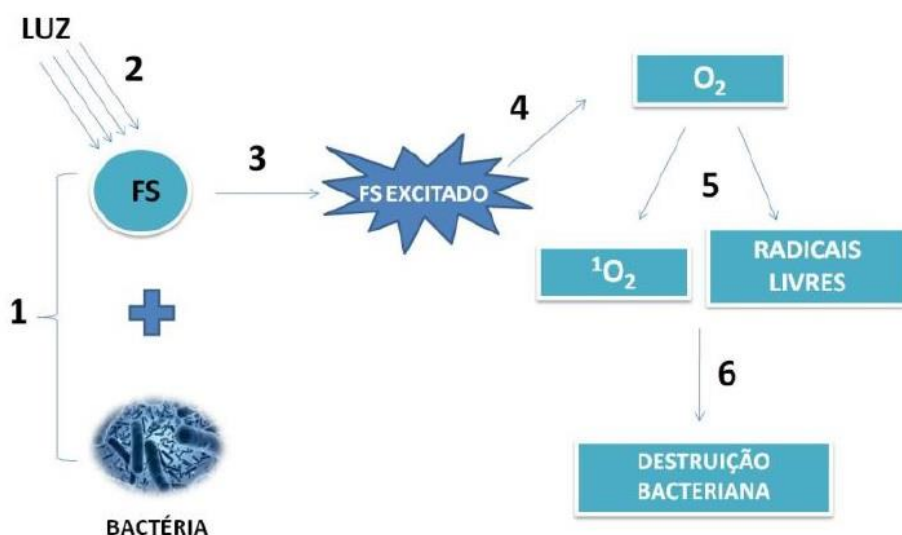


Figura 1. Mecanismo de ação da TFD. Um fotossensibilizador (FS) se liga ao microrganismo (1) e, após a exposição de uma luz de comprimento de onda apropriado (2) passa a seu estado excitado (3). Em sequência, o FS transfere energia proveniente da luz para o oxigênio molecular (4), gerando então oxigênio singlete (1O_2) e radicais livres (5) os quais são citotóxicos às células bacterianas (6). Adaptado de Soukos e Godson (2011).

No mecanismo do tipo I, na qual ocorre uma reação mais fraca de transferência de elétrons entre as moléculas de FS excitadas ao seu triplo estado e uma molécula de substrato inorgânico, ou biomolécula, a qual produz radicais iônicos e radicais livres. Os radicais livres são então capazes de reagir com o oxigênio intra-molecular das células, produzindo espécies altamente reativas de oxigênio, como superóxidos, radicais de hidroxilas e peróxidos de hidrogênio, sendo que tais espécies causam danos irreparáveis a membrana celular (Takasaki *et al.*, 2009).

No mecanismo tipo II, está presente uma maior citotoxicidade. Nesta reação, ocorre a transferência de energia de moléculas excitadas do FS ao seu triplo estado diretamente as moléculas de oxigênio, levando a formação de 1O_2 , sendo considerado a espécie de oxigênio de maior citotoxicidade produzida na TFD (Konan *et al.*, 2002).

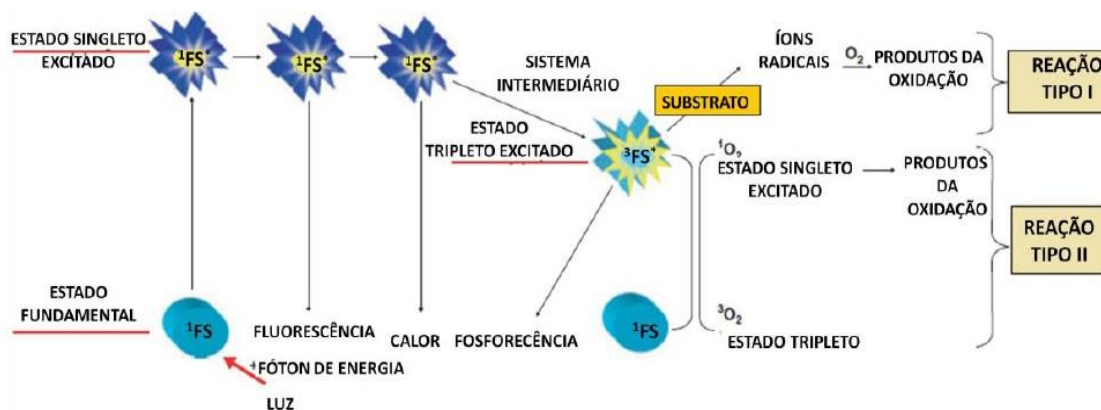


Figura 2. Reações do tipo I e do tipo II na TFD. Adaptado de Soukos e Godson (2011).

O fator que determina a ocorrência das reações do tipo I ou II é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do FS. Atualmente, nos sistemas utilizados, a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de aproximadamente 10%, enquanto para a do tipo II é de até 90%, valores que podem variar a depender das características do FS, bem como da natureza do alvo de sua ação (Borissevitch e Schaberie, 2006). Assim, é possível conferir ao fotoprocesso tipo II a propriedade antimicrobiana da TFD.

O oxigênio singlete é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação celular. Esta forma de oxigênio apresenta um tempo de vida extremamente reduzido ($<0,04\mu\text{s}$) nos sistemas biológicos e, consequentemente, seu raio de ação também é muito baixo ($<0,02\mu\text{s}$) (Redmond e Kochever, 2006). Todavia, o $^1\text{O}_2$ tem a capacidade de oxidar diversas estruturas celulares tais como organelas, proteínas, ácidos nucleicos e colesterol, interagindo principalmente com a membrana citoplasmática e com o DNA dos microrganismos, levando então a lise celular (Soukos e Goodson, 2011). Devido ao seu curto tempo de vida, a migração do oxigênio singlete torna-se limitada dentro do tecido e totalmente dependente do local de aplicação do FS e do perímetro de ação da fonte de luz. Isso permite que a reação apresente uma resposta bem delimitada, o que a torna um mecanismo ideal a ser aplicado em infecções localizadas, sem causar

danos a outras células ou moléculas distantes do local de aplicação (Moan e Berg, 1991). Adicionalmente, a reação é imediatamente interrompida após o desligamento da fonte de luz (Meisel e Kocher, 2005; Takasaki *et al.*, 2009).

Idealmente, nem o FS, nem a fonte de luz utilizados no processo deveriam induzir isoladamente um efeito citotóxico. Portanto, em teoria, o efeito antimicrobiano da TFD só poderia ser atribuído a associação dessas duas variáveis. A eficácia fototerapêutica está na dependência do coeficiente de absorção do corante FS utilizado, na concentração alcançada nas células-alvo e na fonte de energia utilizada (Meisel e Kocher, 2005). Dessa forma, a luz necessária para que aconteça a fotoativação do FS deve ter um comprimento de onda específico e um nível baixo de energia que consiga ser absorvido pelo corante do FS e, dessa forma, desencadear uma reação preferencialmente do tipo II.

2.2.3 A fonte de luz

As primeiras fontes de luz utilizadas como recurso para TFD foram as lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, um forte componente térmico associado e uma grande dificuldade em se mensurar a quantidade de luz aplicada. Com a advento do laser, foi possível utilizar uma luz homogênea de baixa intensidade para ativar a reação fotodinâmica (Ackroyd *et al.*, 2001).

A TFD requer uma fonte de luz de baixa potência, situada na porção visível do espectro eletromagnético e com comprimento de onda específico para o corante de escolha. Atualmente, as fontes de luz mais utilizadas, com seus respectivos comprimentos de onda são: Laser de He-Ne (632,8nm); laser de Diodo AsGaAl (620-690nm); laser de Diodo InGaAlP (635-685nm) e laser de Argônio (488-514nm) (Konopka e Goslinski, 2007; Takasaki *et al.*, 2009).

A disseminação no uso dos lasers como fonte de luz se deu, principalmente, por suas propriedades, tais como concentração elevada de energia; pouca dispersão de energia à medida que a luz se propaga; coerência e

monocromaticidade; possibilidade de iluminação de um meio composto de diversos materiais e seletividade ao interagir com somente um determinado componente (Ackroyd *et al.*, 2001).

Uma alternativa de luz bastante disseminada atualmente tem sido os LEDs. São estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção por diferenças de cargas, ocorre a emissão de luz, com um menor aumento da temperatura em comparação aos lasers. Estes dispositivos são capazes de emitir luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo a emissão espontânea de fótons não coerentes, diferindo-se mais uma vez dos lasers, os quais produzem emissão estimulada de radiação (Karu, 2013).

Os LEDs têm se mostrado como uma opção viável na TFD. Esse fato possivelmente pode ser atribuído a algumas vantagens desta tecnologia, tais como: menor custo; fácil manuseio; baixo componente térmico; luz monocromática; maior tempo de vida útil; possibilidade de aumentar o tempo de irradiação da solução sem causar danos colaterais, dentre outras (Mongardini *et al.*, 2014).

Recentemente, a ação antimicrobiana dos lasers/LED tem sido estudada nas mais diversas áreas da odontologia. Os efeitos destes nos diferentes tecidos estão intimamente relacionados com a distribuição da energia depositada, de modo que a propriedade óptica de cada tecido influencia e determina a extensão e a natureza da resposta tecidual a qual ocorre através dos processos de absorção, transmissão, reflexão e difusão da luz laser (Pinheiro, 1998).

Os principais parâmetros relacionados a luz, em TFD, são (Meisel e Kocher, 2005; Genovese, 2007):

- Energia: Representa a quantidade de luz que está sendo depositada no tecido; dada em Joules (J), sendo representada pela potência, em Watts (W), em função do tempo, em segundos (seg).
- Potência: É a energia capaz de provocar maior ou menor ação fotodinâmica; dada em W e representada pela energia, em J, em função do tempo, em seg.

- Irradiância e densidade de potência: É a potência óptica útil do laser, expressa em W, dividida pela área irradiada, expressa em cm. É através do controle da irradiância que o operador pode gerar a fotoativação.
- Fluência, dosimetria e densidade de energia: É a taxa de energia que está sendo aplicada no tecido biológico, refere-se a unidade de superfície irradiada e não a totalidade de energia emitida, sendo o critério de verificação da eficácia e referência da terapia. Expressa em J/cm², é dada pela irradiância em função do tempo.
- Comprimento de onda: É quem define a profundidade de penetração no tecido alvo. Diferentes comprimentos de onda representam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido. Dependendo do comprimento de onda o tecido absorve mais superficialmente ou mais profundamente, agindo na intimidade tecidual, geralmente na membrana celular.

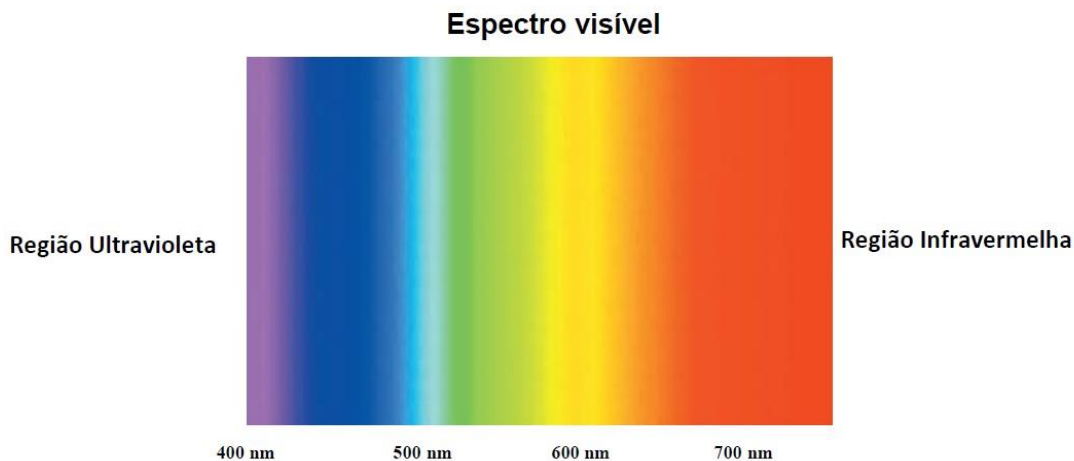


Figura 3. Visualização do espectro eletromagnético. Adaptado de Soukos e Godson (2011).

2.2.4 O fotossensibilizador

É possível afirmar que a grande maioria das bactérias bucais não absorvem luz visível. Assim, a utilização de um agente de absorção óptica não-tóxico que se

fixe à parede bacteriana atraindo para si luz, proveniente de um laser ou LED, no momento da irradiação, é essencial para que decorra uma ação antimicrobiana sobre as células-alvo (Wilson, 1993).

São de fundamental importância para o processo de fotossensibilização as propriedades físico-químicas dos agentes FS e dos sistemas biológicos em que irão atuar. Não necessariamente um agente que absorve a luz incidente tem a capacidade de atuar como um FS. Idealmente, um FS deve ainda ser livre de características tóxicas às células do hospedeiro; apresentar ainda toxicidade local somente após a ativação da luz; permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir sua interação com as células vizinhas e então desencadear o resto do processo; ter alta solubilidade em água, soluções injetáveis e substitutos do sangue; alta afinidade e penetração no tecido acometido por doença em detrimento ao tecido saudável, por meio de seletividade (Meisel e Kocher, 2005; Konopka e Goslinski, 2007).

A afinidade das bactérias parece ainda estar relacionada a diferentes tipos de FS. De modo geral, os neutros ou aniônicos são efetivos na eliminação de bactérias gram-positivas, enquanto nas gram-negativas somente se acumulam na membrana externa. Esse evento se dá pelo fato da porosidade relativa da membrana de espécies gram-positivas permitirem a difusão do FS para sítios sensíveis; já a membrana externa presente nas gram-negativas atua como barreira física entre a célula e o ambiente. Para estas, o FS deve ser catiônico, ou ainda ser conjugados com anticorpos monoclonais, que tem a capacidade de atravessar a membrana (Wainwright, 1998; Hamblin e Hasan, 2004; Kömerik e MacRobert, 2006).

Durante as aplicações da TFD espera-se que o corante una-se aos microrganismos ou ainda ultrapasse a membrana citoplasmática, invadindo o interior da célula. Para que isso ocorra então, é necessário um tempo de pré-irradiação (TPI), ou seja, um tempo compreendido entre a aplicação do FS no alvo

e sua ativação pela fonte de luz. Os tempos utilizados na TFD antimicrobiana tendem entre 1 e 10 minutos (Ribeiro *et al.*, 2005).

Outro componente importante a ser levado em consideração é o comprimento de onda de luz necessário para a foto-excitação do composto. Quanto maior o comprimento de onda incidente, maior é seu grau de penetração no tecido, na região visível de luz. Assim, as substâncias fotossensíveis a serem utilizadas na TFD devem absorver na região próxima ao infravermelho (Levy, 1995). Deve-se observar ainda que acima de 800nm ocorre a absorção da radiação pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite máximo (Simplicio *et al.*, 2001).

Diversos FS têm sido utilizados na TFD, dentre eles destacam-se: o azul de metileno, o azul de toluidina O, conjugados de clorina, porfirina, eritrosina, corantes naturais (Wainwright e Crossley, 2004).

2.2.5 TFD em odontologia

A partir dos anos 90 iniciou-se o estudo do potencial impacto da TFD em biofilmes orais, quando Dobson e Wilson (1992) analisaram a redução bacteriana de *Aa*, *Fn* e *Pg*, sugerindo que a TFD seria efetiva em eliminar bactérias em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica.

A aplicabilidade desta terapia tem-se destacado principalmente por algumas vantagens apresentadas, em comparação a outros antimicrobianos locais, tais como: técnica não invasiva e conveniente para o paciente; baixo risco; possibilidade de repetição das doses; seletividade; atuação local; melhoria na qualidade de vida; efeitos adversos moderados; baixo custo; fácil manuseio; erradicação de micro-organismos em curto tempo, desenvolvendo assim pouca, ou nenhuma resistência, evitando, inclusive, a perturbação da microbiota normal, sendo então uma útil alternativa aos antibióticos e antissépticos (Zanin e Gonçalves, 2003).

As propriedades antimicrobianas da TFD têm tornado-a uma potencial candidata no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e virais da cavidade oral. Diferentes usos em odontologia têm sido propostos, com resultados

satisfatórios, em diferentes áreas, incluindo dentística, endodontia, prótese, estomatologia, além da periodontia (Soukos e Goodson, 2011).

Em relação a cárie dental, sabe-se que esta resulta de uma ruptura no equilíbrio entre os minerais presentes nos dentes e os biofilmes microbiológicos orais. Bactérias como Sm e espécies de *Lactobacillus*, secretam ácidos orgânicos como subproduto do metabolismo da fermentação de carboidratos, processo este que pode culminar na desmineralização e cavitação do esmalte e dentina em seus estágios avançados. A TFD pode então agir prevenindo a fermentação e eliminando as bactérias envolvidas, oferecendo benefícios como a aplicação não invasiva de uma droga; rápida eliminação das bactérias e um curto tempo de exposição da luz, aplicada em uma pequena área específica; sem causar resistência. Estudos comprovaram que a utilização de corantes tais como o azul de toluidina O, por meio de ação fotodinâmica, são capazes de agir como antimicrobiano em culturas planctônicas de Sm também na fase de biofilme (Willians *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2006; Bevilacqua *et al.*, 2007). Resultados pré-clínicos *in vitro* validam a TFD como terapia promissora em relação a bactérias cariogênicas. Todavia, mais estudos clínicos são necessários para viabilizar esta abordagem no tratamento e prevenção da cárie (Soukos e Goodson, 2011).

Já na área de endodontia, o principal objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação da infecção dos canais radiculares. Falhas, durante ou após o tratamento, normalmente são atribuídas a presença residual de microrganismos aeróbios gram-positivos ou ainda gram-negativos restritos. A presença de *Enterococcus faecalis* em falhas no tratamento de canal tem sido relatada na literatura. A TFD, em associação a instrumentação mecânica dos canais radiculares, foi capaz de reduzir a presença destes microrganismos, bem como potencializar a eliminação destes, quando comparada a instrumentação mecânica como abordagem isolada (Garcez *et al.*, 2010). A TFD tem mostrado resultados promissores por meio de aplicações no campo da endodontia, com uma significância particular em relação a rapidez com a qual o efeito pode ser gerado.

Estudos experimentais futuros podem beneficiar ainda mais o uso, investigando uma ação mais específica nos túbulos dentinários (Soukos e Goodson, 2011).

A TFD também é considerada um método efetivo para a efetivação de *Candida albicans*, microrganismo relacionado com infecções oportunistas graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos como no HIV, o qual tem a capacidade de crescer em mucosas orais, bem como na superfície de próteses. Tratamentos antifúngicos com agentes como a nistatina e miconazol podem induzir resistência, limitando severamente a capacidade de erradicar os biofilmes fúngicos, justificando infecções recorrentes (Jabra-Rizk *et al.*, 2004). Inúmeros estudos foram capazes de mostrar o potencial, *in vitro*, da TFD em eliminar *Candida*, seja no estado planctônico (Cormick *et al.*, 2009; Giroldo *et al.*, 2009; So *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010) ou em biofilme (Donnelly *et al.*, 2007; Dovigo *et al.*, 2011), utilizando uma vasta gama de FS. Esses achados são ainda suportados por estudos em humanos, a exemplo de um o qual observou uma significativa redução da inflamação de lesões de candidose no palato de sujeitos portadores de próteses totais, após a utilização de porfirina como FS, em associação a um LED azul (37,5 J/cm²) (Sakima *et al.*, 2007).

O laser de baixa potência tem ainda sido utilizado, na área de estomatologia, para o tratamento de herpes labial, no intuito de diminuir a frequência de aparecimento das lesões, proporcionando satisfação e conforto aos pacientes. Assim, a TFD também desponta como uma possibilidade. Um estudo demonstrou que a TFD realizada em herpes labial, na fase de vesícula, aplicando-se azul de metileno 0,01% em associação a um laser de baixa potência de AsGaAl, foi capaz de acelerar o reparo da lesão em apenas uma semana, sem relato de dor nem desconforto (Wilson, 2004). Resultados semelhantes também foram observados a partir do uso de um protocolo similar (Marotti *et al.*, 2009).

Ainda na estomatologia, TFD tem sido utilizada no tratamento de diferentes tipos de tumores orais sólidos e, adicionalmente, investigações em relação a aplicação de TFD para tratamento de lesões pré-cancerosas orais superficiais, como leucoplasia oral, eritroleucoplasia oral e hiperplasia verrucosa oral, têm sido

amplamente realizadas, com algum sucesso (Fan *et al.*, 1996; Kubler *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2008). Além disso, a TFD tem sido efetivamente aplicada no tratamento de líquen plano (van de Meij *et al.*, 2003; Aguahosseini *et al.*, 2006).

É possível perceber que o potencial das aplicações de TFD parece ser ilimitado. Elas são capazes de agir não só nas condições orais comuns como a cárie e a doença periodontal, mas também em condições como câncer oral, periimplantites, tratamento endodôntico, candidose, dentre outras. Características como a baixa toxicidade, a rapidez dos efeitos, baixa recorrência de efeitos adversos, bem como o baixo potencial para resistência microbiana, são qualidades de destaque relacionados a TFD. Sugerem-se maiores evidências clínicas para comprovar a eficácia e viabilizar esse tipo de tratamento na odontologia (Soukos e Goodson, 2011). Porém resultados promissores são evidentes e as oportunidades são visíveis.

2.2.6 TFD em periodontia

Os biofilmes supra- e subgingivais, os quais colonizam as superfícies dentais e as células epiteliais que revestem as bolsas periodontais/sulco gengival são os mais complexos que existem na natureza (Soukos e Goodson, 2011). Esses biofilmes incluem um subconjunto de aproximadamente 700 espécies bacterianas (Kumar *et al.*, 2005), os quais podem culminar nas diferentes formas da doença periodontal, incluindo a gengivite e a periodontite.

A remoção mecânica do biofilme é atualmente o método mais frequentemente utilizado no tratamento não só da gengivite, como já foi descrito, mas também das demais formas da doença periodontal. Agentes antimicrobianos também são amplamente utilizados, porém as espécies presentes no biofilme exibem diversos mecanismos de resistência a esses, somando-se ao fato relacionado a dificuldade em se manter concentrações terapêuticas efetivas dos antimicrobianos na cavidade oral (Wilson, 2004; Anderson e O'Toole, 2008; Matesanz-Pérez *et al.*, 2013). Assim, após a TFD despontar como uma importante

ferramenta nas demais áreas da odontologia, este mecanismo é sugerido como alternativa aos agentes antimicrobianos em periodontia.

Qin *et al.* (2008) compararam a eficácia da TFD como monoterapia ou terapia coadjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) em periodontite induzida em modelo animal, utilizando ratos. Para tanto, 6 semanas decorridas da indução da doença nos molares superiores, as ligaduras de algodão foram removidas e os animais foram alocados para 3 grupos distintos: somente RAR, somente TFD, controle. Os sítios correspondentes do grupo TFD receberam como terapia a aplicação de azul de toluidina O (1 mg/ml) como FS e irradiação feita por um LED (635nm de comprimento de onda, 61mW de potência e 159mW/cm² de densidade de energia) com o auxílio de uma ponteira de aplicação de fibra óptica (0,8mm de diâmetro). O TPI, no qual o FS permaneceu em contato com a superfície, foi de 10 minutos. Já o tempo de irradiação (TI) foi de 75 seg. O sacrifício dos animais ocorreu após 30 dias. Os resultados revelaram que ambas as abordagens promoveram um significativo efeito bactericida sobre o biofilme, quando comparadas ao controle ($p < 0,001$), porém sem diferença estatística entre si. Outras diferenças tais como em relação aos sinais clínicos da inflamação ou à quantidade de infiltrado inflamatório foram observadas para ambos os grupos porém sem diferenças entre eles. Assim, os autores sugerem eficácia da TFD no tratamento da periodontite, representando um potencial recurso clínico.

Também em ratos, de Almeida *et al.* (2008a) testaram a TFD em sítios com periodontite induzida por ligaduras de algodão. Decorridos dois dias de indução da doença, os animais foram aleatorizados para 3 grupos distintos: controle (somente indução da doença), TFD, ou somente FS. Os sítios pré-determinados do grupo TFD receberam a aplicação de azul de metileno (100mg/ml) como FS e irradiação feita por um laser de AsGaAl (0,05W de potência, 0,03W/cm² de densidade de energia) com um TI de 1 minuto, e o grupo somente FS recebeu somente a aplicação do azul de metileno proposto. Uma menor reabsorção óssea na região de furca foi observada aos 7 dias no grupo TFD, em comparação aos demais grupos.

Já aos 15 dias, ambos os grupos teste apresentaram menores taxas de reabsorção óssea em comparação ao grupo controle. Todavia, aos 30 dias não observou-se diferenças intergrupos. Assim, os autores sugeriram com estes resultados que a TFD consiste em uma possível alternativa no controle da reabsorção óssea na região de furca decorrente da periodontite.

Estes achados corroboram ainda com outro estudo (Komerik *et al.*, 2003), no qual a doença periodontal foi induzida nos ratos por meio da inoculação de Pg. Os autores utilizaram como protocolo para o grupo teste a aplicação de azul de toluidina (1mg/ml) como FS, em associação a um LED (630nm de comprimento de onda; 0,1W de potência e 6, 12, 24, 48 J de energia) acionado por 1, 2, 4 e 8 minutos.

Outros estudos em modelo animal, com ratos portadores de doença periodontal experimental induzidas por meio de ligaduras de algodão, foram também capazes de demonstrar resultados relevantes a favor da TFD como terapia coadjuvante, reduzindo a reabsorção óssea em ratos diabéticos (de Almeida *et al.*, 2008b), em ratos imunossuprimidos (Fernandes *et al.*, 2009). Adicionalmente, Carvalho *et al.* (2011) observaram além da redução na reabsorção óssea, diminuição na taxa de migração de neutrófilos e na expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sugerindo um efeito modulador da TFD na resposta imuno-inflamatória.

Outros achados importantes relacionam-se com os fatores de virulência. Komerik *et al.* (2000) relataram a redução de lipopolissacarídeos (LPS) e proteases associada a aplicação de azul de toluidina O como FS. Estes resultados corroboram com os encontrados por Zanin e Brugnera Jr (2007), que também sugeriram que a TFD parece ter alguns efeitos sobre fatores de virulência microbianos, como os LPS presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas.

Ainda é possível verificar a eficiência da TFD avaliando-se o perfil microbiológico, bem como o padrão de citocinas presentes. De Oliveira *et al.* (2011) avaliaram os propostos parâmetros em cães. A doença periodontal foi induzida por

meio de ligaduras de seda colocadas ao redor dos pré-molares mandibulares bilateralmente, mantidas em posição durante 8 semanas. Os cães foram randomicamente distribuídos para 3 grupos distintos: somente raspagem e alisamento radicular (RAR), somente TFD, TFD+RAR. Os sítios correspondentes dos grupos TFD e TFD+RAR receberam como terapia a aplicação de cloreto fenotiazínico como FS e irradiação por um LED (660nm de comprimento de onda, 0,06W de potência e 212,23J/cm² de fluência) com auxílio de um ponta de fibra óptica de 0,06cm de diâmetro. Por meio da análise de amostras de biofilme e de biópsias gengivais, os autores sugeriram que a RAR e a TFD em aplicações únicas, ou ainda associadas, afetam diferentes espécies microbianas e tem efeitos similares na expressão de citocinas durante o processo de tratamento de periodontite induzida por ligaduras.

Sabe-se que estudos clínicos são de extrema importância no processo de validação de uma nova terapia. Pesquisas recentes, realizadas em humanos, têm revelado resultados promissores da TFD na doença periodontal. A partir de uma análise mais detalhada da literatura relacionada a TFD, é possível inferir que o modo mais comum de aplicação desta terapia na doença periodontal é em conjunto a RAR, através de uma única sessão de aplicação de TFD.

Seguindo esse modo de aplicação, Theodoro *et al.* (2012) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da TFD, a longo prazo, em periodontite crônica. Três sítios, dos 33 pacientes selecionados para o estudo, foram alocados de maneira randomizada para receber RAR, RAR + FS ou RAR + TFD. Os sítios do grupo RAR + TFD receberam como protocolo a aplicação de azul de toluidina O (100µg/ml) como FS, com TPI igual a 1 minuto, e irradiação feita por um laser de baixa intensidade de AsGaAl (660nm de comprimento de onda, 30mW de potência, 4,5J de energia) com um TI de 2 minutos e, e o grupo RAR + FS recebeu somente a aplicação do mesmo azul de toluidina O. Nos resultados observou-se que todos os grupos de tratamento apresentaram melhoras em todos os parâmetros clínicos avaliados, além de uma significativa redução na proporção de sítios positivos para

periodontopatógenos decorrido 60, 90 e 180 dias do início do estudo ($p < 0,05$). Nenhum dos parâmetros periodontais mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Após 180 dias, o tratamento com TFD conduziu a uma significativa redução na porcentagem de sítios positivos para todas as bactérias, em comparação ao grupo RAR ($p < 0,05$). Assim, dentro dos limites deste estudo, os autores concluíram que a TFD como terapia coadjuvante no tratamento periodontal conduz a diferenças estatisticamente significantes em alguns dos periodontopatógenos chaves, porém sem alterações perceptíveis clinicamente.

Já Betsy *et al.* (2014) encontraram efeitos positivos nos parâmetros clínicos após a associação da TFD a RAR no tratamento de periodontite crônica. Estes autores utilizaram para o grupo RAR + TFD a aplicação de azul de metileno (10mg/ml) como FS, com TPI igual a 3 minutos, e irradiação feita por um LED (660nm de comprimento de onda, 1W de potência, 60mW/cm² de poder de densidade) por mais 1 minuto. Todavia, estes achados clínicos devem ser interpretados com cautela pois foram observados somente a curto prazo, decorrido 1 mês de acompanhamento.

Outra situação em que a TFD pode ser aplicável é na presença de bolsas residuais, persistentes mesmo após a terapia mecânica convencional. Campos *et al.* (2013) avaliaram o uso coadjuvante da TFD frente a esta situação, para dentes monorradiculares. Um total de 13 pacientes foram incluídos neste estudo modelo boca dividida. As bolsas residuais selecionadas foram alocadas para receber RAR + TFD ou RAR. O sistema de laser incluiu um LED (660nm de comprimento de onda, 60mW de potência, 129J/cm² de energia de densidade) em associação ao azul de metileno (10mg/ml) como FS, com um TPI igual a 1 minuto, seguido por 1 minuto de TI. Os parâmetros clínicos melhoraram significativamente para ambas as terapias propostas ($p < 0,05$), porém uma maior redução na PS e um maior ganho no NIC foram observados no grupo RAR + TFD, após 3 meses ($p < 0,05$). Adicionalmente, sítios tratados pela abordagem combinada apresentaram uma significativa redução no número de sítios com PS < 5mm sem SS após 3 meses, em

comparação aos sítios do grupo RAR ($p < 0,05$). Assim, os autores sugeriram que a TFD como terapia coadjuvante ao debridamento mecânico demonstrou benefícios clínicos adicionais em bolsas residuais presentes em dentes unirradiculares, despontando como uma estratégia terapêutica alternativa durante a terapia periodontal de suporte.

Resultados clínicos e microbiológicos positivos foram encontrados por Mongardini *et al.* (2014), que também investigaram os efeitos da TFD como terapia coadjuvante no tratamento de bolsas residuais. Neste caso, o protocolo de TFD incluiu um LED vermelho (628nm de comprimento de onda, 1,000mW de potência, 2,000mW/cm² de poder de densidade) em associação ao azul de toluidina O (0,1mg/ml) como FS, com um TPI igual a 1 minuto, seguido por 40 segundos de TI. Após 1 semana da aplicação, 73% dos sítios controle e 27% dos sítios teste apresentavam SS. Adicionalmente, em termos microbiológicos, maiores reduções nas proporções relativas de bactérias do complexo vermelho foram observadas nos sítios teste (68,8 vs. 4,1 %; $p = 0,01$). Todavia, estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois refletem achados a curto prazo (apenas 1 semana de acompanhamento).

Kolbe *et al.* (2014) investigaram a eficácia da TFD como monoterapia durante a terapia periodontal de suporte. Uma amostra de 22 pacientes com periodontite crônica os quais apresentavam ao menos 3 bolsas residuais, com PS ≥ 5 mm com sangramento à sondagem (SS) foi recrutada. Os sítios então selecionados foram alocados randomicamente para 3 grupos distintos: TFD; FS ou RAR. Os sítios do grupo TFD receberam como protocolo a aplicação de azul de metileno (10mg/ml) como FS, com TPI igual a 1 minuto, e irradiação feita por um LED (60mW de potência, 129J/cm² de dose de energia) por mais 1 minuto, e o grupo somente FS recebeu somente a aplicação do mesmo azul de metileno. Os resultados demonstraram que todas as terapias propostas promoveram benefícios similares em relação aos parâmetros clínicos ($p < 0,05$), com exceção do SS que não reduziu no protocolo com FS ($p > 0,05$). Nos grupos TFD e RAR observou-se

menores níveis de Aa aos 3 meses em comparação ao grupo FS ($p<0,05$). Uma frequência de detecção menor de Pg foi atribuída ao protocolo de TFD em 3 e 6 meses, e a abordagem RAR decorridos 6 meses do início do estudo ($p<0,05$). Adicionalmente, o tratamento com TFD como monoterapia apresentou uma menor frequência de Pg aos 3 meses em comparação as demais abordagens ($p<0,05$). Já em relação ao padrão de citocinas, somente pacientes que receberam TFD exibiram um aumento significativo nos níveis de interleucinas anti-inflamatórias, como a IL-4, bem como uma redução nas citocinas inflamatórias, a exemplo da IL-1 β e da IL-6 ($p<0,05$). A análise inter-grupo revelou ainda uma redução nos níveis de IL-10 e um aumento em IFN- γ e IL-1 β favorecendo o grupo FS em comparação às demais terapias durante os acompanhamentos ($p<0,05$). Para morbidade, nenhuma diferença foi observada entre as abordagens propostas ($p>0,05$), apesar da taxa de necessidade de uso de anestesia ter sido alta para o grupo RAR ($p<0,05$). Assim, os autores sugerem que a TFD como terapia exclusiva pode ser considerada uma alternativa não invasiva no tratamento de bolsas residuais, oferecendo aparentes vantagens na modulação de citocinas.

Outro estudo (de Oliveira *et al.*, 2009) também avaliou os efeitos da TFD como monoterapia, só que desta vez em pacientes com diagnóstico de periodontite agressiva. Para tal análise, investigou-se os níveis de citocinas no FGC destes pacientes. Um total de 10 pacientes foi selecionado para esse estudo de boca dividida. Os sítios foram alocados para receberem TFD ou RAR. Os sítios do grupo TFD receberam como protocolo a aplicação de fenotiazina (10mg/ml) como FS, com TPI igual a 1 minuto, e um LED (60mW /cm² de potência máxima) com TI de 1 minuto. Reduções significativas nos níveis de TNF- α foram observadas decorridos 30 dias do tratamento. Níveis similares de TNF- α e de fator nuclear kappa B ligante (RANKL) foram observados nos diferentes tempos para ambos os grupos, sem diferença estatística. Assim, este estudo preliminar foi capaz de relatar que TFD e RAR mostraram efeitos semelhantes no FGC de pacientes com periodontite agressiva.

Franco *et al.* (2014) também investigaram os efeitos da TFD no tratamento de periodontite agressiva, porém como abordagem coadjuvante à terapia mecânica. Uma outra característica relevante deste estudo foi a utilização de aplicações seriadas de TFD, ao invés de uma única aplicação, o que parece melhorar a performance da terapia proposta. O protocolo de TFD utilizado incluiu 4 aplicações, com um intervalo de uma semana entre cada sessão, a aplicação de azul de metileno (0,01%) como FS, com TPI igual a 5 minutos, e um LED (660nm de comprimento de onda, 60mW /cm² de potência e 5,4J/cm² de energia de densidade) com auxílio de uma ponta de fibra óptica (0,4mm de diâmetro) com um TI de 1 minuto e meio. Além de uma maior redução em relação à SS a favor do grupo teste, os autores observaram um aumento significativo na expressão de fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), o qual é de extrema importância no processo de reparo periodontal.

Outro estudo recente (Moreira *et al.*, 2014) também avaliou o impacto de aplicações seriadas de TFD, como coadjuvante a terapia mecânica, em pacientes diagnosticados com periodontite agressiva. Utilizando um desenho de boca dividida, 20 pacientes periodontite agressiva generalizada foram tratados com RAR (controle) ou RAR + TFD (teste). Parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos foram analisados. Os sítios alocados para realização de TFD receberam como protocolo a aplicação de um FS, com TPI igual a 1 minuto, e um LED (670nm de comprimento de onda, 75mW de potência máxima) com auxílio de uma ponta de fibra óptica (0,6mm) com um TI igual a 1 minuto. Os resultados revelaram efeitos positivos em bolsas profundas (PS≥7mm no *baseline*) com relação a PS e NIC a favor do grupo teste após 90 dias (p<0,05). Além disso o grupo que recebeu TFD também demonstrou uma maior redução dos periodontopatógenos dos complexos laranja e vermelho e uma menor proporção de IL-1β e IL-10, em relação ao grupo que só recebeu RAR (p<0,05). Assim, os autores sugeriram que a aplicação seriada de TFD, como coadjuvante a RAR, promoveu benefícios clínicos, microbiológicos e imunológicos no tratamento de bolsas

periodontais profundas em dentes unirradiculares em pacientes portadores de periodontite agressiva.

Um maior potencial em relação as aplicações seriadas de TFD também foi encontrado por Petelin *et al.* (2013), ao investigar a aplicação desta terapia isoladamente, em comparação a RAR e ao debridamento ultrassônico (DU), em pacientes diagnosticados com periodontite crônica. Para o protocolo de TFD foram realizadas 3 aplicações seriadas, em um intervalo de 1 semana. Utilizou-se cloreto de fenotiazina como FS, um TPI de 3 minutos, em associação a um LED (660nm, 60mW/cm²) com auxílio de uma ponta de fibra óptica. Todos os 3 tratamentos propostos resultaram em melhoras clínicas significantes. O tratamento com TFD destacou-se por promover benefícios clínicos e microbiológicos relevantes, principalmente quando associada a DU. Assim, essa abordagem pode ser uma alternativa importante para bolsas residuais rasas e profundas em indivíduos em terapia de suporte.

Uma outra indicação possível para o uso coadjuvante da TFD consiste na aplicação em regiões de furca. Luchesi *et al.* (2013) investigaram essa abordagem. Um estudo clínico duplo-cego, paralelo, randomizado e controlado foi realizado incluindo 37 pacientes portadores de furca classe II, sendo que 16 pertenciam ao grupo teste (TFD), e 21 ao grupo controle (somente FS, sem ativação do laser). O sistema de luz incluiu um LED (660nm de comprimento de onda, 60mW de potência, 129J/cm² de dosagem de energia) em associação a azul de metileno (10mg/ml) como FS. Para TFD, o TPI foi de 1 minuto, e o TI foi equivalente. Os parâmetros clínicos melhoraram para ambos os grupos ($p < 0,05$) porém sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Uma redução em Pg e Tf foi observada aos 6 meses somente para o grupo teste ($p < 0,05$), sem diferença entre os grupos. Em relação a análise das citocinas, os níveis de IL-4 e IL-10 aumentaram para ambos os grupos aos 6 meses. Os níveis de fatores estimulantes de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-8, IL-1 β e IL-6 reduziram somente no grupo TFD, aos 3 meses ($p < 0,05$). Neste mesmo período, a análise inter-grupos mostrou que os

níveis de GM-CSF foram menores no grupo TFD. Aos 6 meses menores níveis de IL-1 β foram somente observados no grupo teste ($p<0,05$). Assim, os autores sugeriram que a TFD não promoveu benefícios clínicos para furcas classe II, porém vantagens em relação aos níveis de citocinas e uma redução dos periodontopatógenos foram demonstradas.

Em uma meta-análise, Atieh (2010) investigou sistematicamente a efetividade da TFD como terapia coadjuvante à terapia mecânica no tratamento da periodontite crônica. Quatro estudos clínicos randomizados e controlados (RCT) foram incluídos, sendo que destes três utilizaram cloreto de fenotiazina e um azul de metileno como FS. O uso desta terapia coadjuvante proposta foi associado com um maior ganho significativo no nível de inserção clínica e uma maior redução na profundidade de sondagem, quando comparada a realização de RAR como monoterapia. Assim, o autor reconhece uma melhora em determinados parâmetros clínicos, porém ressalta a necessidade de cautela na interpretação dos achados, devido ao pequeno número de estudos incluídos.

Em outra revisão sistemática com meta-análise Azarpazhooh *et al.* (2010) avaliaram também a ação da TFD, porém analisaram esta como monoterapia, além de terapia coadjuvante no tratamento de pacientes com diagnóstico de periodontite. As variáveis primárias avaliadas foram NIC e PS. A partir de 24 estudos potencialmente elegíveis pré-selecionados, 5 RCTs foram incluídas na revisão sistemática, sendo que destes 4 utilizaram cloreto de fenotiazina e um azul de metileno como FS. Observou-se que a associação entre RAR e TFD provocou um ganho no NIC, acompanhado de redução na PS. Porém, esses resultados ainda não possuem relevância clínica, devido a pequena variação numérica, sugerindo então que são necessários RCTs mais bem delineados para confirmar o potencial clínico desta terapia.

Resultados clínicos semelhantes foram encontrados em outra revisão sistemática com meta-análise (Sgolastra *et al.*, 2013). Os autores investigaram a eficácia antimicrobiana da TFD como coadjuvante a terapia mecânica de RAR, em

pacientes com periodontite crônica. Um total de 14 RCTs foram incluídos no estudo, sendo que destes 8 utilizaram cloreto de fenotiazina e 6 azul de metileno como FS. Os dados revelaram um ganho no NIC, acompanhado de redução na PS. Os autores sugeriram que o uso coadjuvante da TFD a terapia convencional de RAR promove benefícios, porém a curto prazo. As evidências para suportar a eficácia clínica a médio e a longo prazo ainda são insuficientes. Assim tornam-se necessário RCTs de maior qualidade, afim de investigar a influência de fatores confundidores potenciais na eficácia do uso coadjuvante da TFD.

De maneira geral, estudos de maior impacto científico como as revisões sistemáticas e meta-análises sugerem limitações no uso da TFD devido, principalmente, a evidências insuficientes sobre o efeito a longo prazo. Este fato pode ser explicado pelo uso de diferentes protocolos de TFD (diferentes tipos de FS, concentrações e tempo de aplicação prévia; diferentes tipos de fontes de luz com diferentes comprimentos de onda, densidades de energia, e energia; TPI, duração da aplicação de luz e frequências de aplicação da TFD), prejudicando assim as possíveis comparações entre os estudos.

2.3 Curcumina

A curcumina é um pigmento natural, fenólico, com cor amarelada intensa, isolado a partir de raízes da planta *Curcuma longa*, juntamente com demetoxi-curcumina e bisdemetoxi-curcumina (Epstein *et al.*, 2010; Bhawana *et al.*, 2011). É um constituinte do tempero açafrão, e está em uso em todo o mundo, mas principalmente na Ásia, como um tempero de cozinha, aromatizantes, corantes e medicação caseira. Tem sido descrita em diversos estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório, quando utilizado via oral ou ainda topicamente (Abe *et al.*, 1999; Ramsewak *et al.*, 2000; Literat *et al.*, 2001; Martins, 2009).

Em seu estado natural, a curcumina apresenta uma característica significativa de ser insolúvel em água. Já em meio alcalino esta é solúvel, apesar de sofrer rápida degradação em meio básico, resultando então em condensação do corante e

formação se subprodutos à base de metano, os quais podem ser indesejáveis (Tønnesen *et al.*, 2002). Assim, esforços têm sido feitos no intuito de viabilizar a solubilidade da curcumina em água (Bhawana *et al.*, 2011; Rego-Filho *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm proposto que os efeitos terapêuticos da curcumina podem, eventualmente, ser aumentados por combinação com a luz (Dahl *et al.*, 1989; Chignell *et al.*, 1994; Bruzell *et al.*, 2005; Dujic *et al.*, 2009), assim atraindo pesquisadores para explorar a sua utilização em diversas áreas, incluindo Fotoquímica e Fotobiologia. Um número de estudos considerável concentrou-se na farmacocinética, segurança e eficácia da utilização da curcumina, em seres humanos. Além disso, a fotossensibilização de alguns microrganismos bucais pela curcumina já tem sido investigada (Haukvik *et al.*, 2011; Hegge *et al.*, 2011). A curcumina tem mostrado ainda vantagens econômicas, considerando o baixo custo, o simples manuseio e a boa efetividade (Gupta *et al.*, 2013).

A capacidade da curcumina absorver a luz é devida a presença de dois sistemas conjugados de elétrons. Ainda é essa capacidade de absorver luz que confere a coloração amarelada a este pigmento. Assim, é possível sugerir que as propriedades químicas e biológicas de suas moléculas podem ser alteradas na presença da luz, além de possivelmente potencializadas (Dahl *et al.*, 1989).

Em decorrência da alta capacidade de absorção de luz em comprimentos de ondas próximos ao azul, entre 300 e 500nm, com ponto máximo em 430nm, sugere-se que a curcumina seja um potencial FS no tratamento de lesões superficiais, uma vez que estas não requerem profunda penetração da luz nos tecidos (Araújo *et al.*, 2012).

Em relação a toxicidade deste pigmento, houve uma evolução significativa com o realizar dos estudos. Tønnesen *et al.* (1987) mostraram com seus resultados que a citotoxicidade não estava relacionada aos produtos provenientes do processo de fotossensibilização da curcumina, tais como ácido ferúlico e valinina, mas pareciam estar dependentes da presença do oxigênio. Resultados estes os quais foram pioneiros para a associação hoje reconhecida entre o efeito citotóxico e a formação de oxigênio singlete (Chignell *et al.*, 1994), peróxido de hidrogênio e

superóxido (Dahl *et al.*, 1994; Dovigo *et al.*, 2011). Outra característica observada em relação a curcumina é que este pigmento possui baixa toxicidade no escuro, o que é desejável em um potencial FS (Dahl *et al.*, 1994; Meisel e Kocher, 2005).

Dahl *et al.* (1989) avaliaram o efeito citotóxico da curcumina na presença de uma fonte de luz em bactérias Gram-negativas. Uma maior ação citotóxica contra essas bactérias, principalmente em *Staphylococcus aureus*, foi encontrada em decorrência da terapia proposta. Por determinação amperométrica, encontrou-se ainda que a reação de fotoativação da curcumina não produz oxigênio singleto, mas sim peróxido de hidrogênio que, apesar de possuir um efeito menos citotóxico, possui um período de ação antimicrobiana relativamente mais longo. Adicionalmente, esse FS não apresentou efeito citotóxico sem a fotoativação nas concentrações utilizadas.

Outro estudo (Chignell *et al.*, 1994) investigou os efeitos fotoquímicos da curcumina em diferentes meios de diluição, incluindo ainda uma avaliação dos tipos tóxicos produzidos. Os autores verificaram que solventes apróticos, como tolueno, benzeno e acetonitrila, favoreceram a produção de uma maior quantidade de oxigênio singleto, quando comparados a solventes próticos. Assim, quando concentrações semelhantes de curcumina foram obtidas pela diluição em etanol, isopropanolol, docedil sulfato de sódio e micelas de Triton-X em “água pesada” (D₂O: oxigênio e deutério) foram utilizadas, observou-se uma queda de 10 vezes na produção de oxigênio singleto. Os autores verificaram também que a produção desta forma hiperativa de oxigênio é pouco dose-dependente da disponibilidade de O₂ no meio. O estudo apresenta ainda uma discussão sobre se a possibilidade de diluição de altas concentrações de curcumina em solventes aquosos ou água, poderia resultar em produção de peróxidos e uma maior produção de oxigênio singleto.

Assim, na busca pela solubilidade deste FS em água, Bhawana *et al.* (2011) incorporaram moléculas de curcumina a nanopartículas, com vista a melhorar a sua solubilidade em fase aquosa e examinar o efeito sobre as suas propriedades

antimicrobianas. Nanopartículas de curcumina (nanocurcumina) foram preparadas por um processo baseado na técnica de moagem úmida e foram delineados a ter uma distribuição de tamanho de partículas entre a estreita faixa compreendida entre 2-40nm. As comparações foram feitas entre microconcentrações de nanocurcumina diluída em água e curcumina natural diluída em DMSO. Menores concentrações inibitórias mínimas de solução de curcumina nanoparticulada foram necessárias para inibir o crescimento de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*. Os resultados demonstraram que a solubilidade em água e a atividade antimicrobiana da curcumina melhoraram marcadamente por redução do tamanho de partícula até a faixa de nano. Para os microrganismos selecionados, a atividade de nanocurcumina foi mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. Adicionalmente, a sua atividade antibacteriana foi muito melhor do que a atividade antifúngica. O mecanismo da ação antibacteriana das nanopartículas de curcumina foi investigada por micrografia eletrônica de transmissão (MET), a qual revelou que estas partículas introduzidas no interior da célula bacteriana por ruptura completa a parede celular, culminam em morte celular, aumentando ainda mais sua efetividade.

Motivados em relação às propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos compósitos à base de curcumina, as características de um novo sal solúvel em água à base de curcumina foram investigadas em outro estudo (Rego-Filho *et al.*, 2014) por meio de absorção e espectroscopia de fluorescência. Para o preparo da solução foi utilizada uma solução-mãe concentrada (30% em peso) de sal de curcumina, contendo os três principais sais curcuminóides (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina), incluindo ainda a adição de água e N-metil-D-glucamina, com um peso molecular final de $730,32\text{g.mol}^{-1}$, gerando soluções de diferentes concentrações (50, 100 e 150 $\mu\text{g/ml}$), com a adição de água destilada. A fotodegradação foi investigada através de um conjunto de LEDs em três diferentes comprimentos de onda (405nm, 450nm e 470nm) para iluminar uma solução aquosa

de curcumina, avaliando a sua degradação em cinco diferentes tempos de exposição (0, 5, 15, 45 e 105 minutos). Os resultados foram comparados com medições equivalentes de degradação no escuro e iluminação na presença de um inibidor de oxigênio singleto. Para medir a fluorescência, foi utilizada uma fonte de laser de baixa potência de 405nm de comprimento de onda. O tempo de fotodegradação da curcumina foi observado, assim como comparado a degradação natural das amostras deixadas no escuro. Dois principais picos de absorção foram detectados, relacionando-se diretamente a concentração da solução e do comprimento de onda da fonte de iluminação. Os autores confirmaram então a produção de oxigênio singleto *in vitro*, indicando um forte potencial deste composto para ser usado como um FS ativado por uma luz azul.

Alguns estudos clínicos preliminares têm sugerido o uso de curcumina como FS. Araújo *et al.* (2012) avaliaram a susceptibilidade dos patógenos pertencentes a flora salivar à TFD após a sensibilização com curcumina e luz azul. Um total de 13 voluntários foram selecionados para o estudo, alocados randomicamente a receberem 3 tratamentos distintos: somente curcumina (L-D+); TFD (L+D+) e controle (L-D-). Para os pacientes que receberam TFD foi utilizada curcumina (1,5g/L) como FS, em associação a um LED (450nm de comprimento de onda, 67mW/cm² de intensidade, e uma fluência estimada de 20,1J/cm²). Os pacientes dos grupos L-D+ e L+D+ bochecharam 20ml de solução de curcumina por 5 minutos e, adicionalmente, para os pertencentes ao grupo L+D+ o LED foi ativado por 5 minutos. Amostras de saliva foram coletadas para contagem bacteriana no início do estudo e após a fase experimental. Após a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) verificou-se uma diferença considerável entre os dois grupos experimentais em relação à eficácia da redução bacteriana. No grupo L-D+, o declínio bacteriano foi consideravelmente inferior (9%) do que em L+ D+, com uma diminuição de 68% nas bactérias. Uma redução estatisticamente significativa na população bacteriana foi observada apenas no grupo de terapia fotodinâmica (p<0,05). Assim os autores sugerem que, dentro das limitações do estudo tais como

tamanho da amostra, tempo de duração do efeito, falta de especificidade em relação aos microrganismos afetados, a TFD foi eficaz na redução microbiana na saliva. Nenhuma redução significativa foi encontrada para o grupo em que foi utilizado apenas curcumina, provando a ausência de toxicidade da droga escuro.

Um estudo clínico mais recente (Leite *et al.*, 2014), melhor delineado, também avaliou os efeitos antimicrobianos da TFD durante 2 horas após a desinfecção bucal com curcumina e luz azul. Para isso, um estudo controlado randomizado foi realizado. Vinte e sete adultos foram divididos aleatoriamente em três grupos: (1) o grupo de TFD, que foi tratado com curcumina e luz azul ($n = 9$); (2) o grupo de luz, que foi tratado apenas com a luz azul, e nenhum fármaco ($n = 9$) e; (3) o grupo curcumina, que foi tratado apenas com a curcumina e nenhuma luz ($n = 9$). Os parâmetros de irradiação foram: LED de $455 \pm 30\text{nm}$ de comprimento de onda, 400mW de potência óptica média, TI igual a 5 minutos, a área de iluminação de $0,6\text{cm}^2$, $600\text{mW}/\text{cm}^2$ de intensidade, e $200\text{J}/\text{cm}^2$ de fluência. Foi utilizada uma solução de estoque de curcumina ($1,5\text{ g/L}$), preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) ($0,1\%$) e diluída em água destilada autoclavada (980 ml) para obter a concentração final utilizada de 30mg/L . As amostras de saliva foram coletadas para contagem bacteriana no início do estudo e após as fases experimentais (imediatamente após o tratamento, e 1 e 2 h após o tratamento). O grupo TFD mostrou uma redução significativa do número de UFC imediatamente após o tratamento, com diferenças significativas para os 3 tempos de análise pós tratamento, em comparação ao *baseline*. Não houve mudanças significativas para o grupo luz. O grupo curcumina mostrou um aumento significativo de UFC 1 h. O grupo TFD mostrou diferença significativa na redução microbiana ($p < 0,05$) em comparação com ambos os grupos de luz e curcumina até 2 h de pós-tratamento. Assim os autores sugerem que o novo dispositivo de LED azul utilizado para a TFD em associação a curcumina pode ser utilizado para a redução de microrganismos salivares, levando à desinfecção geral da boca (por exemplo, mucosa, da língua e de saliva), mas novos protocolos devem ser explorados.

Baseando-se nestes achados, Paschoal *et al.* (2014b) avaliaram, mais recentemente, os efeitos anti-inflamatório e antimicrobiano da aplicação de TFD utilizando curcumina como FS em comparação ao uso de verniz de clorexidina sobre o acúmulo de placa e sangramento gengival em adolescentes sob tratamento ortodôntico fixo. Para tal, um ensaio clínico randomizado foi realizado com um número inicial de 45 pacientes que foram distribuídos em três grupos distintos: grupo I (verniz de clorexidina 2%), o grupo II (verniz placebo), e grupo III (TFD). Os voluntários do grupo TFD bochecharam 5 ml de solução de curcumina ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) totalizando 1 minuto de TPI, expelindo-a logo em seguida. Após o bochecho, os dentes corados foram expostos a luz LED (450nm de comprimento de onda, 165 mW/cm^2 de densidade de potência, 96 J/cm^2 de fluência), por um TI de 10 minutos, em 3 diferentes áreas (direita, esquerda e centro). Os tratamentos foram realizados por quatro vezes consecutivas, com um intervalo de uma semana cada. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para IP entre os grupos durante o *baseline* e após 1 mês. O grupo III apresentou uma diferença significativa entre o grupo I e grupo II aos 3 meses de acompanhamento, para IP. Neste mesmo período, houve mais acúmulo de placa com diferença estatisticamente significativa em comparação com os outros períodos para todos os grupos estudados. Houve uma redução de IG estatisticamente significativa nos grupos I e III com 1 mês de acompanhamento e em relação aos outros períodos. Os resultados apresentados demonstraram que a aplicação de TFD mediada pela curcumina e uma luz LED azul representa uma abordagem promissora em relação aos antimicrobianos para a prevenção e tratamento de gengivite em adolescentes sob tratamento ortodôntico. Todavia, existem limitações dentro do estudo que incentivam a realização de novos ensaios clínicos randomizados.

3. PROPOSIÇÃO

- Avaliar a ação da TFD (utilizando curcumina a 10% em associação a um LED azul) como coadjuvante a remoção mecânica do biofilme supragengival, no controle da gengivite em pacientes utilizando aparelhos ortodônticos fixos, comparando com a remoção mecânica como monoterapia; mensurando a quantidade de biofilme, a presença de sangramento e a profundidade de sondagem, a curto prazo.
- Avaliar se a terapia proposta é capaz de alterar o perfil inflamatório por meio da análise do fluído gengival.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este foi um estudo clínico paralelo, cego, randomizado e controlado, o qual comparou os efeitos da TFD como coadjuvante a profilaxia (pTFD) e profilaxia como monoterapia (PA) no controle da gengivite em pacientes utilizando aparelhos ortodônticos fixos. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Protocolo **076/2013**).

4.2 Triagem dos indivíduos

A seleção dos pacientes se iniciou em setembro de 2013 e foi concluída em fevereiro de 2014. As avaliações clínicas e os procedimentos foram realizados entre fevereiro de 2014 e outubro de 2014. As análises dos dados juntamente com a avaliação estatística foram feitas em novembro de 2014. Todos os voluntários foram selecionados a partir de uma amostra de conveniência em tratamento no curso de especialização da Área de Ortodontia (Departamento de Odontologia Infantil, Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

Os pacientes encontravam-se na fase de alinhamento e nivelamento do tratamento ortodôntico. Os componentes fixos utilizados consistiram em: Bráquetes do tipo Standard (Edgewise Standard System, cod. 10.30.901, Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil); arcos de aço 0.14" ou 0.16" redondos e amarrilhos de aço 0.20 ou 0.25 para amarrar o fio aos bráquetes.

Os pacientes incluídos no presente estudo foram diagnosticados com gengivite induzida por placa modificada por fatores locais (Armitage, 1999). Os critérios de inclusão utilizados no processo de seleção dos pacientes compreenderam em (a) estar em tratamento ortodôntico com componentes fixos há pelo menos 6 meses; (b) sangramento à sondagem em um par de incisivos contralaterais e um par de molares ou pré-molares contralaterais (com bráquetes

colados); (c) arco de aço em função e (d) idade entre 12 e 24 anos. Os critérios de exclusão foram (a) gravidez; (b) lactação; (c) tabagismo; (d) administração de antibiótico ou anti-inflamatório nos 6 meses prévios ao estudo; (e) condições sistêmicas reportadas na anamnese que pudessem afetar o progresso da doença periodontal; (f) tratamento periodontal prévio nos últimos 6 meses; (g) sinais de mobilidade e oclusão traumática; (h) retração gengival; (i) uso de anéis elásticos e (j) dentes bandados. Todos os voluntários foram informados dos potenciais riscos e benefícios de sua participação no estudo e assinaram (ou seus responsáveis o fizeram, quando menores de 18 anos de idade) o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.3 Protocolos de tratamento

Todos os pacientes foram informados sobre as causas e as consequências da doença periodontal, bem como técnicas de prevenção, incluindo escovação e uso do fio dental. Estas últimas orientações foram dadas ao final de cada sessão de maneira padronizada para todos os indivíduos. Escova de dentes (Twister Fresh, Colgate, S. B. do Campo, São Paulo, Brasil) e creme dental (Total 12 Gengiva Saudável, Colgate, S. B. do Campo, São Paulo, Brasil) foram fornecidos aos voluntários no *baseline* e repostos sempre quando necessário. Fatores de retenção de biofilme, tais como cavidades de cárie, restaurações em excesso, cálculo supragengival, foram removidos no *baseline*, bem como no tempo restante, se necessário.

Os sítios selecionados previamente durante a triagem foram alocados de forma randomizada, por uma lista gerada em computador, para receber pTFD ou PA. (Figura 4)

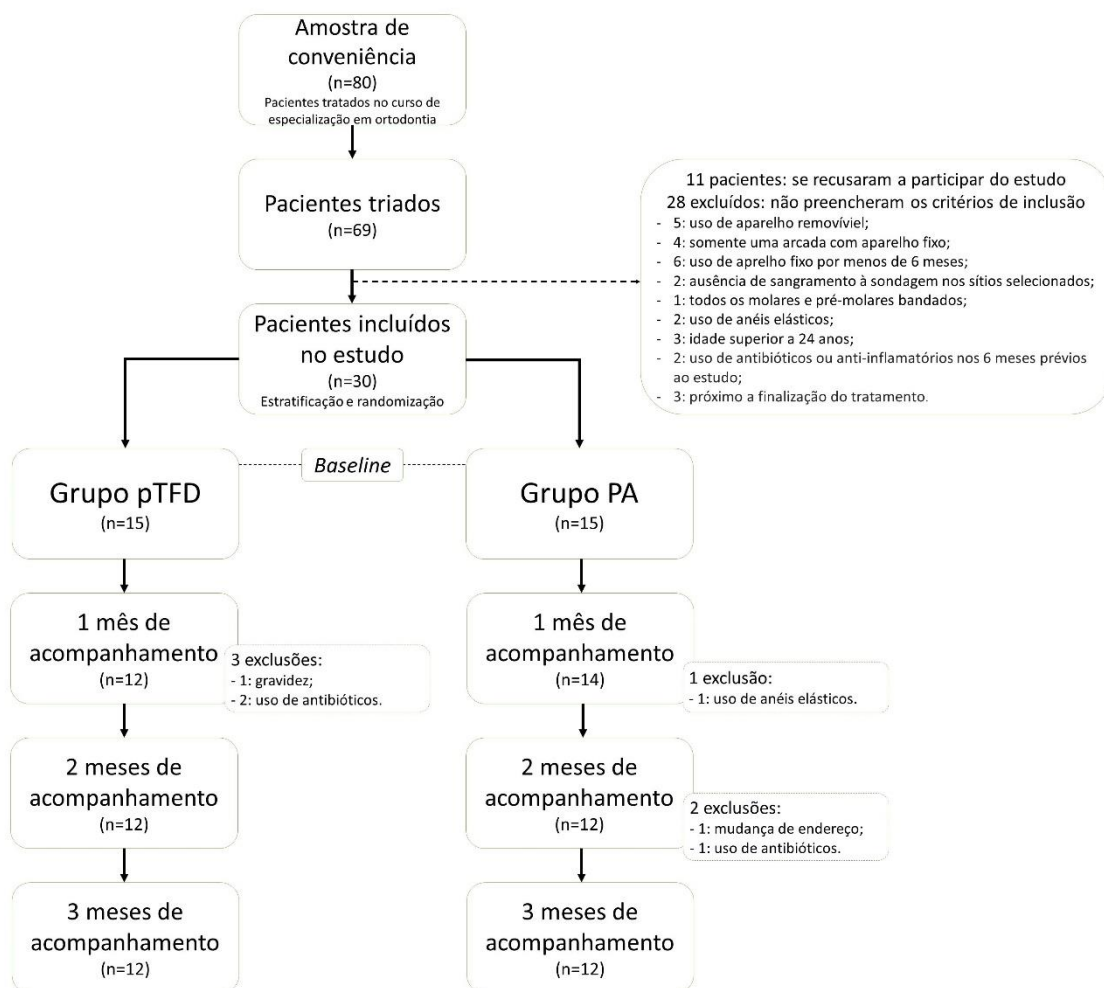


Figura 4. Fluxograma do estudo.

O sistema de laser incluiu um LED protótipo desenvolvido pelo Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica e Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de física de São Carlos, São Paulo, Brasil. O aparelho emitia luz azul de comprimento de onda de 450nm, potência de 310mW e poder de densidade de 122,04mW/cm², por meio de uma ponteira lateral. O mesmo foi utilizado juntamente a uma solução de curcumina 10% (CUR). Esta foi inicialmente diluída em água destilada segundo informações do fabricante (PDT-Pharma, Cravinhos, São Paulo, Brasil). Cada sachê continha 66,7% de N-metil-d-glutamina; 17,8% de curcumina e 15,5% de outros curcuminóides (Rego-Filho *et al.*, 2014). Uma vez diluído o sal de

curcumina, a solução foi acondicionada em frascos de coloração âmbar envolvidos em papel alumínio, na intenção de proteger a solução de influências da luz ambiente.

4.3.1 Profilaxia

O procedimento de profilaxia foi realizado utilizando pasta profilática (Shine, Maquira, Maringá, Paraná, Brasil) aplicada com auxílio de escova de Robson (CA, Microdont, Socorro, São Paulo, Brasil), adaptada em contra-ângulo e motor de baixa rotação. Esta terapia foi aplicada em toda a cavidade bucal, incluindo todas as faces dentárias, de maneira padronizada para ambos os grupos de estudo. Todos os pacientes (grupos teste e controle) receberam profilaxia mensalmente, iniciando-se no *baseline* até 3 meses de estudo (Figura 5).

4.3.2. Terapia fotodinâmica

Após o isolamento dos sítios de estudo previamente escolhidos com roletes de algodão estéreis, um volume de 0,1ml de CUR foi aplicado com auxílio de uma seringa descartável de volume equivalente a 1ml (Descarpack, São Paulo, São Paulo, Brasil) e agulha hipodérmica (BD, São Paulo, São Paulo, Brasil) na margem gengival das faces vestibular, mesio-vestibular e disto-vestibular dos dentes previamente selecionados, com um TPI de 1 minuto, seguido de 1 minuto de TI (Figura 6). Somente o grupo pTFD recebeu este protocolo, no *baseline*, semanalmente durante o primeiro mês e mensalmente até o terceiro mês (Figura 5).

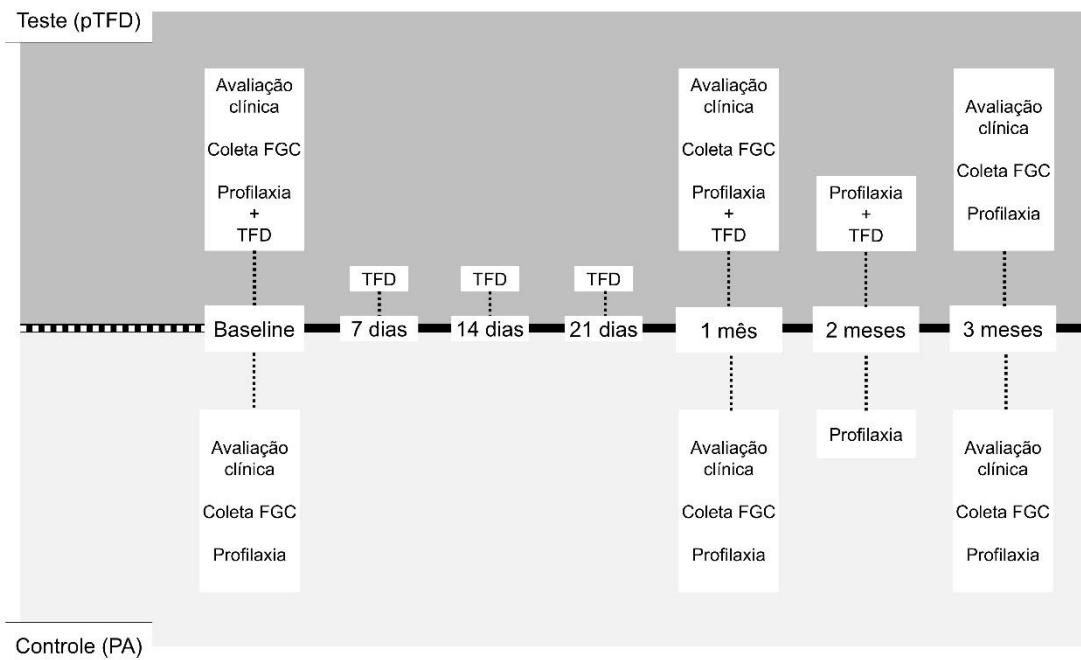


Figura 5. Linha do tempo de execução das terapias propostas.

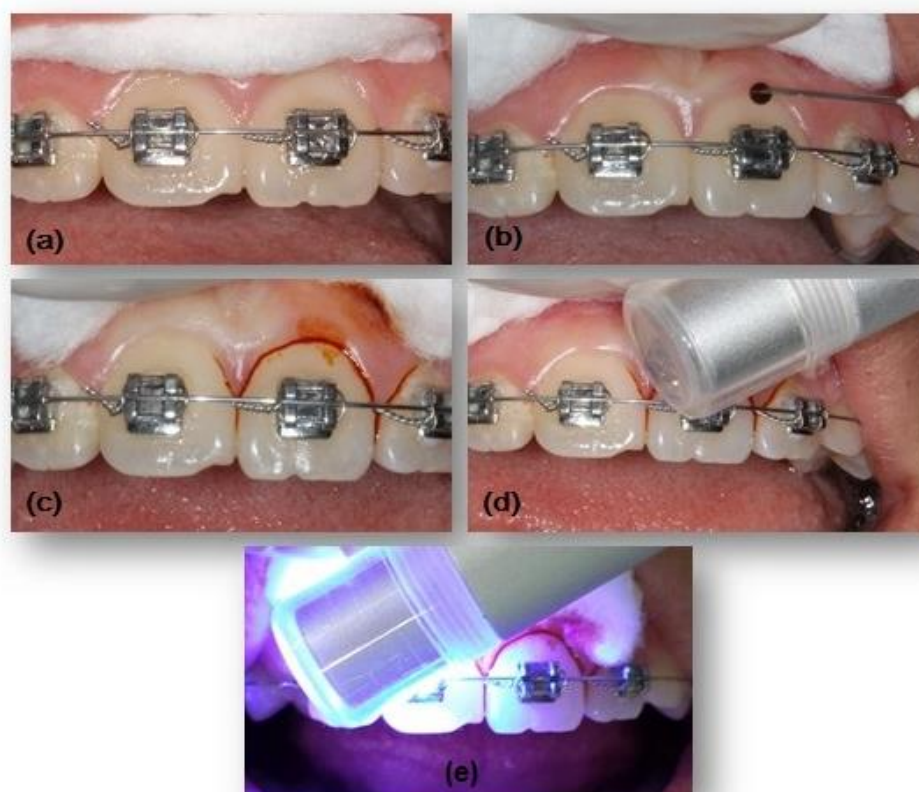


Figura 6. Sequência de aplicação da TFD. Situação clínica pré-operatória (a) de um incisivo superior. Aplicação da CUR na margem gengival (b e c). Exposição ao LED (d e e).

A randomização não foi quebrada até que todos os dados fossem coletados. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador (VSB).

4.4 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando $\alpha=0,05$ e um poder de $(1-\beta)$ 80 %. Para a variância ($r=SD$), o valor de 1mm foi usado, considerando PS nos sítios iniciais como variável primária. O valor mínimo clinicamente (δ) considerável foi de 1mm. Determinou-se então que uma amostra mínima composta de 12 pacientes para cada grupo era necessária. Todavia, considerando possíveis perdas durante os acompanhamentos, o número de pacientes selecionados na triagem foi de 15 pacientes por grupo.

4.5 Parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos foram avaliados no *baseline*, imediatamente antes das terapias propostas, 1 e 3 meses após. Os seguintes índices periodontais foram mensurados, considerando 6 faces por dente: mudanças no nível de inserção clínica (NIC); na profundidade de sondagem (PS); índice gengival (IG; Løe, 1967); índice de placa (IP; Ainamo e Bay, 1975) e sangramento à sondagem (SS; Mühlemann e Son 1971). Todos os parâmetros foram mensurados com auxílio de uma sonda periodontal Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

O mesmo examinador (ALFS), cego para os tratamentos, realizou todas as mensurações durante as avaliações clínicas. Para a realização da calibração intra-examinador, 15 indivíduos não relacionados ao presente estudo, diagnosticados com doença periodontal, foram selecionados. O examinador mensurou NIC de todos os pacientes duas vezes em um período de até 24h. O examinador foi considerado reprodutível após cumprir os critérios de sucesso predeterminados (porcentagem de concordância dentro de ± 1 mm entre as repetições das mensurações de pelo menos 90%), sendo que o valor alcançado foi de 97% para NIC.

4.6 Avaliação do perfil de citocinas

O fluido gengival crevicular (FGC) foi coletado dos sítios experimentais no *baseline*, após 1 e 3 meses. Após a remoção do biofilme supragengival, as áreas de interesse foram secas e isoladas com roletes de algodão esterelizados, tiras de papel absorventes (Periopaper, Oraflow, Plainview, Nova Iorque, Estados Unidos) foram inseridas no sulco gengival até o operador sentir resistência, e deixadas em posição por 15 segundos. O volume de fluido coletado foi mensurado em um equipamento devidamente calibrado (Periotron 8000, Oraflow, Plainview, Nova Iorque, Estados Unidos). As tiras foram armazenadas em microtubos plásticos estéreis (Eppendorf, Westbury, Nova Iorque, Estados Unidos) contendo 400 μ l de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 0,05 de Tween-20. As amostras de

FGC foram armazenadas a -20°C até a realização do imunoensaio utilizando múltiplos analitos (Luchesi *et al.*, 2013).

Os níveis de citocinas foram avaliados por meio de um conjunto ultra sensível de citocinas humanas, com 8 analitos (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Foi possível abranger tanto citocinas pró-inflamatórias [interferon (IFN)- γ , interleucina (IL) IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- α], como anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) na análise, sendo estas representativas das vias inflamatórias Th1, Th2 e Th17. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante por meio do equipamento MAGpix™ (MiraiBio, Alameda, Califórnia, Estados Unidos). As amostras foram individualmente analisadas e suas concentrações foram estimadas a partir de uma curva padrão utilizando uma equação polinomial, através do software Xponent (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). As concentrações médias de cada marcador foram calculadas para as regiões anterior e posterior das arcadas dos pacientes, como unidade estatística, e expressas em pg/ml (Luchesi *et al.*, 2013).

4.7 Reavaliações

Os pacientes compareceram para consulta semanalmente durante o primeiro mês (no grupo pTFD) e mensalmente até o terceiro mês (para ambos os grupos). Ao final de cada visita mensal foi realizado reforço em relação às instruções de higiene bucal, além de reposição do creme dental e da escova, se necessário.

4.8 Gestão de dados e análise estatística

A análise estatística a nível do sujeito foi realizada para cada um dos parâmetros utilizando o software SPSS para Windows, versão 16.0. (SPSS Inc., Chicago, Ilinoís, Estados Unidos). A análise de intenção de tratar foi feita em relação a alteração na média de PS, variável clínica primária, entre as reavaliações. Como a distribuição de dados dos parâmetros clínicos neste estudo não obedeceram à lei de Gauss pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$), foram utilizados métodos não

paramétricos para a análise dos dados. Diferença significativa entre os grupos teste e controle com relação aos dados categóricos foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, ao passo que foi utilizado Mann-Whitney U-teste para a variável contínua. Da mesma forma, o teste de Friedman foi utilizado para encontrar mudanças significativas entre os vários intervalos de tempo dentro dos grupos teste e controle.

5. RESULTADOS

A partir de uma amostra de conveniência de aproximadamente 80 pacientes, 30 indivíduos foram selecionados, todavia 6 destes pacientes foram perdidos ao longo do presente estudo. Assim, um total de 24 pacientes foram incluídos na análise estatística, sendo 12 no grupo teste e 12 no grupo controle. A média de idade foi de $15,67 \pm 3,26$ para o grupo pTFD e $16,25 \pm 2,90$ para o grupo PA. Todos os pacientes reportaram a não ocorrência de efeitos adversos, além de melhora na percepção de sangramento. (Tabela 1)

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos pacientes no *baseline*

Variável	Categoria	Teste (pTFD)		Controle (PA)		p-valor
		n	(%)	n	(%)	
Gênero	Masculino	6	50,00	7	58,33	0,68*
	Feminino	6	50,00	5	41,67	
Nível Educacional	Ensino Fundamental	4	33,33	3	25,00	0,44*
	Ensino Médio	7	58,33	8	66,67	
	Ensino Superior	1	8,33	1	8,33	
Escovação	2 vezes ao dia	3	25,00	5	41,67	0,47*
	3 vezes ao dia ou mais	9	75,00	7	58,33	
Uso do Fio Dental	Sim	6	50,00	6	50,00	1,00*
	Não	6	50,00	6	50,00	
Uso de Métodos Auxiliares	Sim	8	66,67	6	50,00	0,68*
	Não	4	33,33	6	50,00	
Tipo de Métodos Auxiliares	Bochecho	7	58,33	5	41,67	0,46*
	Escova interdental	0	0,00	1	8,33	
	Raspador de língua	1	8,33	0	0,00	

*Teste Qui-Quadrado

5.1 Parâmetros Clínicos

Os índices para todos os sítios dos pacientes - boca toda, no início do estudo estão apresentados na Tabela 2. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos no *baseline* ($p>0,05$).

Tabela 2. Porcentagens (médias $\pm$ DP) de IP, IG e SS, para a boca toda no *baseline*.

Parâmetro	Grupo	<i>Baseline</i>
IP	Teste	85,00 $\pm$ 10,85
	Controle	84,39 $\pm$ 14,77
IG	Teste	45,27 $\pm$ 8,92
	Controle	55,27 $\pm$ 16,59
SS	Teste	57,35 $\pm$ 12,42
	Controle	64,81 $\pm$ 22,36

Para diferenças inter-grupo foi utilizado o teste de Mann–Whitney U, $p < 0,05$.

As médias, em mm, de PS e as porcentagens de IP, IG e SS nos sítios experimentais no *baseline*, 1 e 3 meses após, estão descritas na Tabela 3. Todas as variáveis não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos no *baseline* ($p > 0,05$). Considerando todos os sítios em questão, não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os parâmetros avaliados, em nenhum dos tempos ($p > 0,05$). Houve uma redução significativa para IP e SS em ambos os grupos em relação ao *baseline* ($p < 0,05$). Adicionalmente, os resultados mostraram que a PS diminuiu significativamente nos pacientes do grupo controle em relação ao *baseline* ($p < 0,05$). Dividindo os sítios experimentais localizados nas regiões anterior e posterior das arcadas, também não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os parâmetros avaliados, em nenhum dos tempos, para a região anterior ($p > 0,05$). Houve uma redução significativa para IP e SS em ambos os grupos em relação ao *baseline* ($p < 0,05$). Adicionalmente, os resultados mostraram que IG e PS diminuíram significativamente nos segmentos anteriores dos pacientes do grupo controle em relação ao *baseline* ($p < 0,05$). Para a região posterior, também não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os parâmetros avaliados, em nenhum dos tempos ($p > 0,05$). Houve somente uma redução significativa para IP e SS em ambos os grupos em relação ao *baseline* ($p < 0,05$).

Tabela 3. Médias (mm $\pm$ DP) de PS e médias (% $\pm$ DP) de IP, IG e SS no *baseline*, 1 e 3 meses após, em geral e por região anterior ou posterior.

		Teste				Controle			
		<i>Baseline</i>	1 mês	3 meses	p-valor	<i>Baseline</i>	1 mês	3 meses	p-valor
Geral	PS	2,63 $\pm$ 0,42	2,66 $\pm$ 0,46	2,48 $\pm$ 0,31	0,195	2,56 $\pm$ 0,27	2,36 $\pm$ 0,22	2,44 $\pm$ 0,25	0,012
	IP	93,33 $\pm$ 10,72	82,85 $\pm$ 18,35	61,18 $\pm$ 27,74	0,001	93,29 $\pm$ 9,34	81,67 $\pm$ 14,63	73,66 $\pm$ 16,94	0,002
	IG	53,44 $\pm$ 28,71	42,95 $\pm$ 20,23	41,66 $\pm$ 18,75	0,285	58,79 $\pm$ 24,66	45,85 $\pm$ 14,34	45,11 $\pm$ 21,85	0,215
	SS	100 $\pm$ 0	62,18 $\pm$ 18,26	60,88 $\pm$ 19,83	0,000	100 $\pm$ 0	58,68 $\pm$ 29,62	67,97 $\pm$ 24,74	0,001
Anterior	PS	2,53 $\pm$ 0,52	2,53 $\pm$ 0,49	2,36 $\pm$ 0,31	0,428	2,55 $\pm$ 0,45	2,25 $\pm$ 0,34	2,27 $\pm$ 0,31	0,027
	IP	95,14 $\pm$ 11,49	85,42 $\pm$ 21,06	68,75 $\pm$ 34,66	0,006	95,28 $\pm$ 12,11	80,42 $\pm$ 20,81	73,06 $\pm$ 20,11	0,017
	IG	54,86 $\pm$ 38,67	39,58 $\pm$ 34,29	49,31 $\pm$ 23,96	0,469	60,97 $\pm$ 24,44	35,26 $\pm$ 24,04	40,97 $\pm$ 29,28	0,046
	SS	100 $\pm$ 0	53,47 $\pm$ 25,98	61,11 $\pm$ 21,71	0,000	100 $\pm$ 0	55,14 $\pm$ 38,83	66,39 $\pm$ 27,13	0,001
Posterior	PS	2,73 $\pm$ 0,46	2,67 $\pm$ 0,53	2,58 0,42	0,163	2,73 $\pm$ 0,28	2,52 $\pm$ 0,33	2,65 $\pm$ 0,35	0,123
	IP	91,39 $\pm$ 13,04	80,00 $\pm$ 25,86	55,69 $\pm$ 34,34	0,001	92,5 $\pm$ 14,06	85,42 $\pm$ 18,74	75,83 $\pm$ 22,2	0,006
	IG	51,94 $\pm$ 30,17	47,08 $\pm$ 31,67	35,42 $\pm$ 29,74	0,069	57,5 $\pm$ 33,21	58,75 $\pm$ 28,38	48,33 $\pm$ 26,99	0,636
	SS	100 $\pm$ 0	69,17 $\pm$ 22,11	59,33 $\pm$ 29,45	0,001	100 $\pm$ 0	61,81 $\pm$ 30,96	68,33 $\pm$ 30,39	0,002

Diferenças estatísticas intra-grupo foram observadas pelo teste de Friedman, $p < 0,05$. Não foram observadas diferenças inter-grupos pelo teste Mann–Whitney, $p > 0,05$.

5.2 Níveis de citocinas

Após 3 meses do início do estudo, houve diferenças estatísticas entre os grupos em relação as citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β e IL-8 no segmento anterior, a favor do grupo pTFD ($p < 0,05$). Adicionalmente, IL-8 reduziu no grupo teste em comparação ao *baseline*, no mesmo segmento ($p < 0,05$) e os níveis de IL-1 β no segmento posterior aumentaram ao longo do tempo no grupo PA ($p < 0,05$). (Tabela 4)

Tabela 4. Médias ($\pm$ DP) das concentrações (pg/ml) dos mediadores para ambos os grupos no *baseline*, 1 e 3 meses após.

			IFN- γ	IL-10	IL-17	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	TNF- α
Anterior	<i>Baseline</i>	Teste	3,0 $\pm$ 2,1	2,9 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,9	2,1 $\pm$ 1,0	310,0 $\pm$ 223,1	1,3 $\pm$ 0,9
		Controle	5,3 $\pm$ 3,5	6,0 $\pm$ 4,6	2,3 $\pm$ 1,8	4,2 $\pm$ 3,6	3,8 $\pm$ 3,3	4,6 $\pm$ 4,8	140,9 $\pm$ 96,6	2,2 $\pm$ 1,5
	1-mês	Teste	2,6 $\pm$ 1,6	2,1 $\pm$ 1,1	0,7 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 2,0	1,5 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 1,2	306 $\pm$ 239,2	1,1 $\pm$ 0,6
		Controle	3,9 $\pm$ 2,6	3,3 $\pm$ 2,1	1,6 $\pm$ 1,5	3,4 $\pm$ 1,8	2,1 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 1,8	284,3 $\pm$ 235,9	1,5 $\pm$ 1,0
	3-meses	Teste	1,9 $\pm$ 1,5*	1,5 $\pm$ 1,1	0,5 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,7*	1,0 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 1,6	159,6 $\pm$ 102,9*	0,8 $\pm$ 0,5
		Controle	6,4 $\pm$ 6,0	4,8 $\pm$ 4,1	1,7 $\pm$ 1,8	8,5 $\pm$ 6,3	3,1 $\pm$ 2,8	4,9 $\pm$ 4,1	411,2 $\pm$ 232,9†	2,9 $\pm$ 3,9
	<i>Baseline</i>	Teste	1,6 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	241,2 $\pm$ 162,4	0,6 $\pm$ 0,5
		Controle	1,6 $\pm$ 1,3	1,7 $\pm$ 1,7	0,5 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 1,6	144,7 $\pm$ 131,8	0,7 $\pm$ 0,7
	1-mês	Teste	1,7 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 1,0	0,5 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 1,0	187,2 $\pm$ 214,4	0,8 $\pm$ 0,4
		Controle	2,4 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 0,8	4,5 $\pm$ 4,0	1,3 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 0,8	201,6 $\pm$ 98,8	1,0 $\pm$ 0,4
Posterior	3-meses	Teste	2,0 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 6,1	1,0 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 1,4	303,8 $\pm$ 186,4	1,0 $\pm$ 0,7
		Controle	2,2 $\pm$ 1,0	1,9 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 5,0†	1,0 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 1,8	227,4 $\pm$ 276,1	1,0 $\pm$ 0,7

† Indica diferença do *baseline* pelo teste de Friedman, $p < 0,05$. * Diferenças intra-grupo foram observadas pelo teste de Mann–Whitney, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A remoção mecânica diária do biofilme é a estratégia mais importante na prevenção e no controle das doenças periodontais. No entanto, a maioria da população, particularmente em relação à falta de motivação e destreza manual, não executa uma rotina de higiene bucal de forma eficaz. Além disso, fatores tais como as características de uma superfície podem influenciar a quantidade e a qualidade de biofilme a ser removido (Bernimoulin, 2003). Diante desta situação, pacientes que usam aparelhos ortodônticos fixos compõem um grupo que pode ser beneficiado por terapias coadjuvantes a remoção mecânica do biofilme (Hass *et al.*, 2014). Analisando os benefícios atribuídos a associação entre um laser e um FS contra periodontopatógenos (Soukos e Goodson, 2011), torna-se importante avaliar a performance da TFD no biofilme supragengival. Assim, o presente estudo investigou o uso coadjuvante da TFD ao controle mecânico do biofilme supragengival levando em consideração sua efetividade no manejo de pacientes portadores de gengivite induzida por placa durante o uso de aparelhos ortodônticos fixos.

Sabe-se que a colocação de aparelhos ortodônticos fixos por si só tem um significativo impacto sobre as variáveis clínicas e microbiológicas nestes pacientes (van Gastel *et al.*, 2008; Ireland *et al.*, 2013). Assim, na intenção de tratar as consequências relacionadas ao acúmulo de biofilme durante o tratamento ortodôntico, a remoção mecânica parece ser a opção em consenso. No presente estudo, observou-se um melhor controle do biofilme para ambos os grupos estudados. A escovação manual ou por meio de escovas elétricas, bem como diferentes adaptações nos desenhos das escovas foram testadas em pacientes ortodônticos em uma variedade de estudos. Porém, uma minuciosa avaliação comparando tais escovas nunca foi feita (Ren *et al.*, 2014). Ainda em relação à remoção mecânica do biofilme por meio da escovação, diferentes técnicas motivacionais têm sido propostas para esses pacientes em específico. Archarya *et al.* (2011) encontraram uma redução significativa nos níveis de placa em pacientes

que foram motivados pela demonstração da técnica convencional de escovação, ou por métodos de evidenciação de placa, ou ainda ao ver as bactérias em seu próprio biofilme, por meio de microscopia de contraste, sendo que os resultados inter-grupo favorecem esta última abordagem.

Indivíduos com aparelho ortodôntico fixo muitas vezes apresentam uma eficácia limitada do controle mecânico do biofilme em decorrência das superfícies de retenção adicionais. Uma variedade de medidas de controle químico do biofilme, incluindo a incorporação de agentes antimicrobianos em cremes dentais, bochechos, vernizes, adesivos, entre outros, têm sido utilizados atualmente. A clorexidina parece ser o antimicrobiano mais efetivo na redução de complicações relacionadas ao biofilme em pacientes ortodônticos. Uma recente revisão da literatura (Hass *et al.*, 2014) comparou o uso coadjuvante de clorexidina a 0,12% ou 0,2% à escovação, em pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Foram observadas reduções para IP e IG em todos os grupos avaliados, como no presente estudo, porém, o uso de clorexidina associada despontou com benefícios clínicos adicionais em uma pequena parcela dos estudos. Apesar de existirem evidências claras na literatura favorecendo o uso coadjuvante de agente químicos para o tratamento de gengivite e controle de biofilme em pacientes sem aparelho ortodôntico (Serrano *et al.*, 2014), estudos específicos associando esse tipo de terapia em pacientes ortodônticos ainda são escassos e controversos em relação aos resultados, principalmente a longo prazo.

Assim, a aplicação da TFD durante o tratamento ortodôntico na intenção de controlar a formação do biofilme supragengival, maior causa de gengivite nesta amostra de pacientes, parece ser uma importante alternativa às abordagens coadjuvantes já discutidas.

Adicionalmente, o fato de não terem sido observados achados positivos em relação aos parâmetros clínicos inflamatórios que favorecessem o grupo o qual recebeu TFD como terapia coadjuvante, no presente estudo, em comparação aos que receberam somente profilaxia, pode possivelmente ser explicado pelo efeito

howthorne, conhecido por estar relacionado a uma mudança positiva do comportamento do indivíduo em relação aos objetivos propostos, por estar sendo valorizado. Assim, o fato dos voluntários de ambos os grupos virem regularmente às consultas, receberem adequadas instruções sobre os hábitos de higiene e serem diretamente avaliados em decorrência da melhora nestes, pode ter influenciado a todos de maneira equilibrada, impossibilitando então a TFD de mostrar benefícios clínicos adicionais.

No presente estudo, nenhum dos pacientes relataram efeitos adversos após o tratamento com TFD. A segurança e a eficácia são pontos de destaque para esta indicação. A segurança pode ser proporcionada pela fonte de luz escolhida, sendo o LED um equipamento comum na rotina clínica dos cirurgiões-dentistas; além da curcumina como FS, um corante utilizado tradicionalmente no preparo dos alimentos, especialmente em regiões como o sul da Ásia (Gupta *et al.*, 2013). Além disso, devido a sua absorção óptica localizada na região azul-verde do espectro eletromagnético, os fótons não afetam as estruturas mais profundas (Araújo *et al.*, 2012).

O uso da curcumina como FS na aplicação de TFD tem se mostrado eficaz em produzir oxigênio singlete (Rego-Filho *et al.*, 2014), além de reduzir a quantidade de microrganismos chave presentes no ambiente oral, como *S. mutans*. Resultados promissores *in vitro* (Araújo *et al.*, 2012b; Paschoal *et al.*, 2013; Paschoal *et al.*, 2014a) e *in vivo* (Araújo *et al.*, 2012) estimulam o estudo desta mesma associação em patógenos periodontais, além do possível impacto desse efeito antimicrobiano nos parâmetros clínicos que avaliam a doença periodontal. Um recente estudo de Paschoal *et al.* (2014b) encontrou uma melhor performance da TFD utilizando curcumina como FS em comparação ao uso de verniz de clorexidina sobre o acúmulo de placa e sangramento gengival em adolescentes sob tratamento ortodôntico fixo. Todavia esses achados devem ser interpretados com cautela, já que, apesar de haver uma diferença significativa entre o IP e o IG, a favor do grupo TFD, aos 3 meses e 1 mês, respectivamente, nenhuma das terapias propostas para

foi capaz de reduzir o acúmulo de biofilme e a presença de inflamação gengival em comparação ao *baseline*, se opondo aos resultados do presente estudo, em que ambas as terapias propostas foram capazes de reduzir os parâmetros inflamatórios ao final do estudo.

Apesar de alguns estudos terem mostrado resultados clínicos relevantes a favor do uso da TFD, com uma vasta gama de FS, o impacto a longo prazo ainda deve ser melhor investigado (Atieh, 2010; Azarpazhooh *et al.*, 2010; Sgolastra *et al.*, 2013). Todavia, apesar de uma parcela de estudos não detectarem mudanças clínicas, sinais visíveis, a favor da utilização desta terapia coadjuvante, como no presente estudo, outros componentes podem ser utilizados para avaliar a efetividade, num universo sub-clínico. Estudos em periodontite, mostraram que a redução de periodontopatógenos como Aa, Pg, Pi, Tf é a base para a melhora periodontal expressa pela redução da PS e ganho no NIC (Theodoro *et al.*, 2012; Luchesi *et al.*, 2013; Kolbe *et al.*, 2014).

Neste estudo, decorridos 3 meses do início do estudo, menores níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β e IL-8 foram encontradas a favor do grupo que recebeu TFD. Adicionalmente, IL-8 reduziu significativamente no grupo teste em comparação ao *baseline*, no mesmo seguimento, e os níveis de IL-1 β no segmento posterior do grupo controle ao longo do tempo no grupo controle, agindo de forma a sugerir um aumento da inflamação por se tratar de um componente pró-inflamatório. Estudos tem mostrado que o tratamento de má-oclusões com aparelhos ortodônticos fixos tem a capacidade por si só de aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias como as IL-2, IL-6 e IL-8 no FGC destes pacientes, podendo então ser considerados fatores preditivos para potenciais alterações nos parâmetros inflamatórios durante o tratamento (Basaran *et al.*, 2006; van Gastel *et al.*, 2011). Apesar da relevância, a literatura sobre os efeitos da TFD na imunomodulação dos padrões de biomarcadores na doença periodontal ainda é limitada. Estudos recentes (Luchesi *et al.*, 2013; Kolbe *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2014) sugeriram seu potencial em relação ao controle de citocinas pró-inflamatórias,

em concordância com esta investigação. Fato este que pode ser explicado pela habilidade da TFD em modular a resposta do hospedeiro pela redução na estimulação de linfócitos T, os quais agem na estimulação imune das células apresentadoras de antígeno, inativando os mediadores pró-inflamatórios (King *et al.*, 1999). Franco *et al.* (2014) avaliou a expressão gênica de IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-8, TNF- α , MMP13, FGF2, RANK, RANKL e OPG após o tratamento periodontal utilizando TFD como coadjuvante em pacientes diagnosticados com periodontite agressiva, encontrando resultados positivos para RANK, OPG e FGF2, sugerindo assim uma redução na osteoclastogênese e uma melhora no processo em relação ao processo de destruição periodontal. É possível inferir então que os menores níveis de mediadores pro-inflamatórios como IFN- γ , IL-1 β e IL-8 encontrados neste estudo podem significar melhoras nos parâmetros periodontais, bem como o retardo do desenvolvimento da inflamação, principalmente a longo prazo.

Considerando as evidências muito limitadas de ensaios clínicos controlados avaliando a performance da TFD como uma terapia coadjuvante a remoção mecânica do biofilme supragengival e controle da gengivite, é importante compreender as limitações deste presente estudo. Recentes revisões sistemáticas (Atieh, 2010; Azarpazhooh *et al.*, 2010; Sgolastra *et al.*, 2013) concluíram que o uso da TFD como alternativa clínica ainda é limitado, na ausência de evidências suficientes sobre os efeitos a longo prazo. Este fato pode ser possivelmente explicado pelos diversos protocolos de TFD propostos (diferentes tipos de FS, sua concentração e duração da aplicação; diferentes tipos de luz, com diferentes comprimentos de onda, densidade de potência e energia, duração da aplicação; bem como frequência de aplicação da TFD), por muitas vezes impedindo uma comparação coerente entre este e outros estudos disponíveis. Com relação as limitações das abordagens terapêuticas estudadas até então, no manejo da remoção mecânica do biofilme e controle da gengivite em pacientes ortodônticos, mais estudos, com maiores períodos de acompanhamento devem ser realizados. Frente aos achados relevantes neste estudo, o uso coadjuvante da TFD em

combinação a remoção mecânica do biofilme pode ser uma importante estratégia segura no tratamento de gengivite e controle do biofilme supragengival, representando uma alternativa durante o tratamento ortodôntico. Adicionalmente, é importante enfatizar as inúmeras vantagens desta terapia proposta, tais como segurança, efetividade e relação custo benefício, comparando a outras terapias coadjuvantes comumente utilizadas.

7. CONCLUSÃO

- A associação da TFD como coadjuvante a remoção mecânica do biofilme supragengival por meio de profilaxia, bem como o uso isolado desta última, mostraram ser abordagens válidas em decorrência da diminuição dos parâmetros clínicos avaliados para inflamação, e mostraram ser semelhantes no controle da gengivite relacionada ao uso de aparelhos ortodônticos fixos.
- Apesar de não terem sido detectadas diferenças entre os grupos nos parâmetros clínicos avaliados, o uso coadjuvante da TFD foi capaz de promover mudanças nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β e IL-8 e, conseqüentemente no perfil inflamatório, em comparação ao grupo controle, podendo então sugerir possíveis eventos clínicos a longo prazo.

REFERÊNCIAS*

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

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001 Nov; 74(5): 656-69.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975 Dec;25(4):229-35.

Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 85-105.

Aghahosseini F, Arbabi-Kalati F, Fashtami LA, Djavid GE, Fateh M, Beitollahi JM. Methylene blue-mediated photodynamic therapy: a possible alternative treatment for oral lichen planus. *Lasers Surg Med.* 2006 Jan; 38(1): 33-8.

Alves KM, Goursand D, Zenobio EG, Cruz RA. Effectiveness of procedures for the chemical-mechanical control of dental biofilm in orthodontic patients. *J Contemp Dent Pract.* 2010 Mar 1; 11(2): 41-8.

American Academy of Periodontology. Parameter on plaque-induced gingivitis. *J Periodontol.* 2000 May; 71(5 suppl): 851-2.

Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012a Feb; 30(2): 96-101. doi: 10.1089/pho.2011.3053.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do Internacional Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos de acordo com o Medline.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg.* 2012b Jul; 30(7): 393-9. doi: 10.1089/pho.2011.3195.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec; 4(1): 1-6.

Atieh MA. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(4): 605-613. doi: 10.1111/jcpe.12094.

Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2010; 81(1):4-14. doi: 10.1902/jop.2009.090285.

Baka ZM, Basciftci FA, Arslan U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013 Aug; 144(2):260-7. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.03.022.

Başaran G, Ozer T, Kaya FA, Hamamci O. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 130(1): 7.e1-6.

Ben-Hur E, Malik Z, Dubbelman TM, Margaron P, Ali H, van Lier JE. Phthalocyanine-induced photohemolysis: structure-activity relationship and the effect of fluoride. *Photochem Photobiol.* 1993 Sep; 58(3): 351-5.

Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30 (suppl 5): 7-9.

Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized

controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2014 Jun; 41(6): 573-81. doi: 10.1111/jcpe.12249.

Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A Jr, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of Streptococcus mutans in a planktonic culture. Photomed Laser Surg. 2007 Dec; 25(6): 513-8.

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. doi: 10.1021/jf104402t.

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

Botero JE, Rösing CK, Duque A, Jaramillo A, Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. Periodontol 2000. 2015 Feb; 67(1): 34-57. doi: 10.1111/prd.12072.

Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. Photochem Photobiol Sci. 2005 Jul; 4(7): 523–530.

Burt B; Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. J Periodontol. 2005 Aug; 76(8): 1406-19.

Busscher HJ; Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res. 2010 Jul; 89(7): 657-65. doi: 10.1177/0022034510368644.

Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH, et al. 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. doi: 10.1007/s10103-012-1159-3.

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): 735-740. doi: 10.1089/pho.2010.2969.

Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994 Mar; 59(3): 295-302.

Contreras A, Slots J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1996 Dec; 11(6): 381-6.

Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009 Apr; 44(4): 1592-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.07.026.

Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol.* 1989; 151(2): 183-5.

Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* 1991 May; 61(5): 340-8.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jul; 8(7): 481-90. doi: 10.1038/nrmicro2337.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008a Jun; 79(6):1081-8. doi: 10.1902/jop.2008.070456.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008b Nov; 79(11): 2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103.

Demling A, Heuer W, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Schwestka-Polly R, Stiesch-Scholz M. Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur J Orthod*. 2009 Apr; 31(2): 202-6. doi: 10.1093/ejo/cjn090.

de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba 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. doi: 10.1902/jop.2009.070465.

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) :359-67. doi: 10.1007/s10103-010-0864-z.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol*. 1992 Nov;37(11):883-7.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007 Jan 3; 86(1): 59-69.

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 Apr; 12(2): 104-108.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*.

Photochem Photobiol. 2011 Jul-Aug; 87(4): 895-903. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x.

Dujic J, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Diaz-Alperi J, Bereiter-Hahn R, Kaufmann R, et al. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int J Cancer* 2009 Mar 15; 124(6), 1422–1428. doi: 10.1002/ijc.23997.

Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: The evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010 Jun; 103(11): 1545-1547.

Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer.* 1996 Oct 1; 78(7): 1374-83.

Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009 Mar;36(3):219-28. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x.

Franco EJ, Pogue RE, Sakamoto LH, Cavalcante LL, Carvalho DR, de Andrade RV. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Mar; 11(1): 41-7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.10.002.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod.* 2010 Sep; 36(9): 1463-6. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.001.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia. Ed. Santos, São Paulo, 2007.

Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009 Jan; 24(1): 109-12. Epub 2007 Dec 22.

Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors*. 2013 Jan-Feb; 39(1): 2-13. doi: 10.1002/biof.1079. Epub 2013 Jan 22.

Hadler-Olsen S, Sandvik K, El-Agroudi MA, Øgaard B. The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen--a prospective study. *Eur J Orthod*. 2012 Oct; 34(5): 633-9.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May; 3(5): 436-50.

Haas AN, Pannuti CM, Andrade AK, Escobar EC, Almeida ER, et al. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res*. 2014 Jul 11; 28(spe): 1-8.

Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. A screening of curcumin derivatives for antibacterial phototoxic effects studies on curcumin and curcuminoids. XLIII. *Pharmazie*. 2011 Jan; 66(1): 69–74.

Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: Studies on curcumin and curcuminoids XLII. *J Pharm Sci*. 2011 Jan; 100(1): 174–185. doi: 10.1002/jps.22263. Epub 2010 Jun 23.

Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1990 Mar; 97(3): 213-8.

Ireland AJ, Soro V, Sprague SV, Harradine NW, Day C, Al-Anezi S, et al. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res.* 2014 May; 17(2): 115-23. doi: 10.1111/ocr.12037.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jan; 10(1): 14-9.

Karu T. Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent? *Photomed Laser Surg.* 2013 May; 31(5): 189-91. doi: 10.1089/pho.2013.3510.

Kim SH, Choi DS, Jang I, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, Song JS. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2012 Mar; 82(2):254-60. doi: 10.2319/030311-156.1.

King DE, Jiang H, Simkin GO, Obochi MO, Levy JG, Hunt DW. Photodynamic alteration of the surface receptor expression pattern of murine splenic dendritic cells. *Scand J Immunol.* 1999 Feb; 49(2): 184-92.

Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH Jr, et al. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2014 Aug; 85(8): e277-86. doi: 10.1902/jop.2014.130559.

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000 Nov; 72(5): 676-80.

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

Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006; 25(1-2): 487-504.

Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar; 66(2): 89-106.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007 Aug; 86(8): 694-707.

Kübler A, Haase T, Rheinwald M, Barth T, Mühling J. Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Dec; 27(6): 466-9.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug; 43(8): 3944-55.

Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009 Jul; 36 Suppl 10: 3-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01415.x.

Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg*. 2014 Nov; 32(11): 627-32. doi: 10.1089/pho.2014.3805.

Levy JG. Photodynamic therapy. *Trends Biotechnol*. 1995 Jan; 13(1): 14-8. 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.

Lindel ID, Elter C, Heuer W, Heidenblut T, Stiesch M, Schwestka-Polly R, Demling AP. Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. *Angle Orthod*. 2011 Sep; 81(5):907-14. doi: 10.2319/102210-616.1.

Literat A, Su F, Norwicki M, Durand M, Ramanathan R, Jones CA, Minoo P, Kwong KY. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease (HMD). *Life Sci.* 2001 Dec 7;70(3):253-67.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol.* 1965 May-Jun; 36: 177-87. doi:10.1902/jop.1965.36.3.177.

Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* 1967 Nov-Dec; 38(6): Suppl:610-6.

Lombardo L, Ortan YÖ, Gorgun Ö, Panza C, Scuzzo G, Siciliani G. Changes in the oral environment after placement of lingual and labial orthodontic appliances. *Prog Orthod.* 2013 Sep 11; 14:28. doi: 10.1186/2196-1042-14-28.

Luchesi VH, Pimentel SP, Kolbe MF, Ribeiro FV, Casarin RC, Nociti FH Jr, et al. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013 Aug; 40(8): 781-8. doi: 10.1111/jcpe.12121.

Macrobert AJ, Bown SG, Phillips D. Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use. *Ciba Found Symp.* 1989; 146: 1-241.

Madlena M, Banoczy J, Gotz G, Marton S, Kaan M Jr, Nagy G. Effects of amine and stannous fluorides on plaque accumulation and gingival health in orthodontic patients treated with fixed appliances: a pilot study. *Oral Health Dent Manag.* 2012 Jun; 11(2): 57-61.

Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P, Ribeiro MS. Photodynamic therapy can be effective as a treatment for herpes simplex labialis. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr; 27(2): 357-63. doi: 10.1089/pho.2008.2268.

Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb; 63(2): 337–339.

Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013 Mar; 40(3): 227-41. doi: 10.1111/jcpe.12026.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005 May 13; 79(2): 159-70.

Melo MMC, Cardoso MG, Faber J, Sobral A. Risk factors for periodontal changes in adult patients with banded second molars during orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2012 Mar; 82(2): 224-228. doi: 10.2319/030911-172.1.

Ministério da Saúde, Projeto SB Brasil. Condições de saúde bucal da população brasileira 2010, Resultados Principais. Disponível em [URL: http://dab.saude.gov.br/cnsb/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf](http://dab.saude.gov.br/cnsb/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf). Acesso em 17 de janeiro de 2014.

Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003 Oct; 124(4): 373-8.

Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 1991 Apr; 53(4): 549-53.

Mongardini C, Di Tanna GL, Piloni A. Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan; 29(1): 1-8. doi: 10.1007/s10103-012-1225-x.

Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Nonsurgical Treatment of Aggressive Periodontitis: a Split-mouth Randomized Controlled Trial. *J Periodontol*. 2014 Nov 21:1-17. [Epub ahead of print].

Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971 Oct;15(2):107-13.

Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Sep; 130(3):275.e17-22.

Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol*. 2007 Oct; 78(10): 1911-25.

Øgaard B, Alm AA, Larsson E, Adolfsson U. A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients. *Eur J Orthod*. 2006 Feb; 28(1): 8-12.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976 Mar;34(3):235-49.

Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci*. 2013 Nov 19. [Epub ahead of print].

Paschoal MA, Santos-Pinto L, Lin M, Duarte S. *Streptococcus mutans* photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. *Photomed Laser Surg*. 2014a Mar; 32(3): 175-80. doi: 10.1089/pho.2013.3656.

Paschoal MA, Moura CM, Jeremias F, Souza JF, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in

adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study. *Lasers Med Sci.* 2014b Dec 28.

Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpir B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul 24. [Epub ahead of print].

Pinheiro ALB. Bases físicas dos lasers. In: Brugnara Junior A; Pinheiro ALB. *Lasers na odontologia moderna.* São Paulo: Pancast, 1998. p.27-44.

Pion FLB, Araújo MWB, Feres M, Cortelli SC. Condição periodontal de um subgrupo populacional do município de Guarulhos, SP. *Rev Bras Epidemiol.* 2006; 9(3): 335-345.

Polak D, Martin C, Sanz-Sánchez I, Beyth N, Shapira L. Are anti-inflammatory agents effective in treating gingivitis as solo or adjunct therapies? A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2014 Dec 19. doi: 10.1111/jcpe.12340. [Epub ahead of print].

Pontier JP, Pine C, Jackson DL, DiDonato AK, Close J, Moore PA. Efficacy of a prebrushing rinse for orthodontic patients. *Clin Prev Dent.* 1990 Aug-Sep; 12(3): 12-7.

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

Raab O. Über die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. *Zeit Biol.* 1900; 39: 524–546.

Rafe Z, Vardimon A, Ashkenazi M. Comparative study of 3 types of toothbrushes in patients with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Jul; 130(1): 92-5.

Ramsewak RS, DeWitt DL, Nair MG. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*. 2000 Jul; 7(4): 303-308.

Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 2006 Sep-Oct; 82(5): 1178-86.

Rego-Filho FG, de Araujo MT, de Oliveira KT, Bagnato VS. Validation of photodynamic action via photobleaching of a new curcumin-based composite with enhanced water solubility. *J Fluoresc*. 2014 Sep; 24(5): 1407-13. doi: 10.1007/s10895-014-1422-z.

Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat? *Clin Oral Investig*. 2014; 18(7): 1711-1718. doi: 10.1007/s00784-014-1240-3.

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

Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. *Int J Dent Hyg*. 2008 May;6(2):129-36. doi: 10.1111/j.1601-5037.2008.00283.x.

Sakima SA, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida albicans* presentes em próteses totais [resumo]. 61ª Jornada Odontológica e 21ª Jornada Acadêmica. Revista de Odontologia da Unesp. Ago/2007; 36: número especial. Araraquara – SP. Brasil.

Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Sallum AW et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004 Sep; 126(3): 363-366.

Sanz M, Serrano J, Iniesta M, Santa Cruz I, Herrera D. Antiplaque and antigingivitis toothpastes. *Monogr Oral Sci.* 2013; 23: 27-44. doi: 10.1159/000350465.

Schätzle M, Loe H, Bueglin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003 Oct; 30(10): 887-901.

Schätzle M, Sener B, Schmidlin PR, Imfeld T, Attin T. In vitro tooth cleaning efficacy of electric toothbrushes around brackets. *Eur J Orthod.* 2010 Oct; 32(5): 481-9. doi: 10.1093/ejo/cjp166.

Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive chemical plaque control in managing gingivitis. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2014 Dec 11. doi: 10.1111/jcpe.12331. [Epub ahead of print].

Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013 May; 40(5): 514-26. doi: 10.1111/jcpe.12094.

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

So CW, Tsang PW, Lo PC, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Fong WP. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. *Mycoses.* 2010 May; 53(3): 215-20. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01688.x.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992 Apr; 63 (4 Suppl): 322-331.

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(3): 253-259.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011 Feb; 55(1): 143-66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x.

Souza RA, Magnani MBBA, Nouer DF, Silva CO, Klein MI, Sallum EA, et al. Periodontal and microbiologic evaluation of 2 methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 Oct; 134(4): 506-12. doi: 10.1016/j.ajodo.2006.09.067.

Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000*. 2009; 51: 109-40. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x.

Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci*. 2012 Jul; 27(4): 687-93. doi: 10.1007/s10103-011-0942-x.

Tønnesen HH, Másson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm*. 2002 Sep 5; 244(1-2): 127-35.

Tufekci E, Casagrande ZA, Lindauer SJ, Fowler CE, Williams KT. Effectiveness of an essential oil mouthrinse in improving oral health in orthodontic patients. *Angle Orthod*. 2008 Mar; 78(2): 294-8. doi: 10.2319/040607-174.1.

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

van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Aug; 96(2): 164-71.

van der Meulen FW, Ibrahim K, Sterenborg HJ, Alphen LV, Maikoe A, Dankert J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. *J Photochem Photobiol B.* 1997 Oct; 40(3): 204-8.

van der Veen MH, Attin R, Schwestka-Polly R, Wiechmann D. Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: do lingual brackets make a difference? *Eur J Oral Sci.* 2010 Jun; 118(3): 298-303. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00733.x.

van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *J Clin Periodontol.* 2007 May; 34(5): 423-31.

van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal variables after placement of fixed orthodontic appliances. *J Periodontol.* 2008 Nov; 79(11): 2078-86. doi: 10.1902/jop.2008.080153 .

van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Pauwels M, Coucke W, Carels C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *Angle Orthod.* 2009 Sep; 79(5):915-21. doi: 10.2319/092908-507.1.

van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal parameters after removal of fixed orthodontic appliances. *Eur J Orthod.* 2011 Feb; 33(1): 15-21. doi: 10.1093/ejo/cjq032. Epub 2010 Jul 29.

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

Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents – circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2004; 53: 119-126.

Wiegand A, Bichsel D, Magalhães AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. *J Dent*. 2009 Aug; 37(8): 591-5. doi: 10.1016/j.jdent.2009.03.020.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus Mutans*. *Caries Res*. 2003 May-Jun; 37(3): 190-3.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol*. 1993 Oct; 75(4): 299-306.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May; 3(5): 412-8.

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 May; 78(5): 569-574.

Wolf P, Fink-Puches R, Cerroni L, Kerl H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J Am Acad Dermatol*. 1994 Oct; 31(4): 678-80.

Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral Oncol*. 2008 Jun; 44(6): 595-600. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.08.016. Epub 2008 Jan 18.

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

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

Zanin ICJ, Brugnera Jr A. Terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal. Perionews. 2007; 1(1): 79-85.

ANEXO I



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica no controle do biofilme dentário e em pacientes com doença periodontal**", protocolo nº 076/2013, dos pesquisadores Ana Lívia Fileto Santana, Antonio Wilson Sallum e Viviane Santana Barbosa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/09/2013.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "**Evaluation of the effects of photodynamic therapy on dental biofilm and on patients with periodontal disease**", register number 076/2013, of Ana Lívia Fileto Santana, Antonio Wilson Sallum and Viviane Santana Barbosa, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Sep 13, 2013.

Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta
Coordenadora
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.