UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLA ANDREOTTI DAMANTE

Desenvolvimento e testes *in vitro* de um novo corante para
terapia fotodinâmica em Periodontia

BAURU
2015

CARLA ANDREOTTI DAMANTE

**Desenvolvimento e testes *in vitro* de um novo corante para
terapia fotodinâmica em Periodontia**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, para o Concurso Público de Títulos e Provas visando a obtenção do Título de Livre Docente junto ao Departamento de Prótese, disciplina de Periodontia.

**BAURU
2015**

D18d Damante, Carla Andreotti
Desenvolvimento e testes in vitro de um novo corante
para terapia fotodinâmica em Periodontia / Carla Andreotti
Damante. – Bauru, 2015.
101p. : il. ; 30cm.

Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e
outros meios eletrônicos.

Carla Andreotti Damante

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 721.759 / CAAE 09481614.0.0000.5417

Data: 14/07/2014

Dedico esse trabalho à minha *família* e ao meu
marido *Gustavo*.

AGRADECIMENTOS

Aos meus *colegas de trabalho* na disciplina de Periodontia pela convivência diária agradável e por tudo o que me ensinaram nesses anos. Ninguém cresce sozinho e esse trabalho só foi realizado devido ao suporte paralelo de todos vocês.

As pessoas que colaboraram diretamente para a realização desse trabalho: *Lauro Michielin Neto, Rafael Ferreira, Paula S. B. H. Karam, Luísa Vale, Marcelo Milanda, Rafaela Alavarce Alves, Rodrigo Cardoso Oliveira, Ana Carolina Magalhães, Clóvis Grecco, Heitor Marques Honório, Mariana Zangrando.*

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

A *CAPES, CNPQ, FAPESP* e *USP* pelo financiamento de parte dos experimentos desse trabalho.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

*“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há
esperança para ela.”*

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (Antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT) tem sido utilizada em Periodontia para redução bacteriana de bolsas periodontais na forma de tratamento adjuvante da raspagem e alisamento radicular. Seu efeito em cirurgias periodontais é pouco estudado. Pesquisas recentes têm procurado descobrir novos fotossensibilizadores para aumento da efetividade dessa terapia. O objetivo do presente estudo foi testar *in vitro* um novo corante à base de corantes fenotiazínicos para uso em aPDT, quanto à sua biocompatibilidade e efetividade em eliminar bactérias. Foram realizados testes para avaliar a desmineralização e desgaste causados pelo corante em esmalte e dentina bovinos, bem como o tempo de aplicação ideal para se conseguir efeitos semelhantes ao ácido cítrico; comportamento óptico dos novos corantes em relação aos corantes convencionais; teste de biocompatibilidade de fragmentos de raiz humana, tratados pelo corante, em culturas de fibroblastos gengivais humanos; efetividade dos novos corantes sozinhos ou associados ao laser na eliminação de *S. aureus* e *E. coli*. Nos experimentos de desmineralização e biocompatibilidade foi utilizado um laser vermelho (660nm, 30mW, 45J/cm², 30s) e nos experimentos com bactérias laser vermelho (660nm, 100mW, 45J/cm², 12s). As análises estatísticas foram realizadas com testes paramétricos e não paramétricos (p<0,05). Os resultados mostraram que o novo corante promoveu desmineralização em esmalte (perda de dureza 55,5% e desgaste 10,33µm) e dentina (perda de dureza 65,9% e desgaste 8,37µm) bovinos de forma semelhante ao ácido cítrico, sendo 180s, o tempo mais adequado. Nos ensaios ópticos, observou-se que o novo corante à base de azul de toluidina (NCTBO) reduziu a banda de absorção para 575nm e teve uma fotodegradação mais rápida, enquanto que à base de azul de metileno (NCMB) o pico manteve-se em 660nm com fotodegradação lenta. O crescimento de fibroblastos gengivais humanos sobre superfícies de raiz humanas foi semelhante ao de fragmentos tratados por corante convencional (3,07 x 2,6 células em 72h). O NCTBO quando utilizado sozinho, reduziu *E. coli* e *S. aureus* em 59,6% e 54,6% respectivamente. Quando associado ao laser, a redução de *E. coli* foi de 52,6%. O NCMB associado ao laser reduziu ambas as bactérias em 100%. Concluiu-se que o novo corante promove desmineralização dentária, é biocompatível e eficaz na eliminação de bactérias.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Desmineralização. Técnicas de cultura de células. Bactérias.

ABSTRACT

Development and *in vitro* tests of a new dye for photodynamic therapy in Periodontics

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is used in Periodontics for reduction of bacteria in periodontal pockets as an adjuvant treatment to scaling and root planning. Recent researches aim at finding new photosensitizers in order to improve its effectiveness. The aim of this study was to test *in vitro* the biocompatibility and efficiency of eliminating bacteria of a new phenothiazine-based dye for aPDT in Periodontics. The following tests were performed: magnitude of demineralization and wear in bovine dentin and enamel fragments; the ideal time of application to obtain results similar to citric acid conditioning; optic behavior of new dye compared to conventional dyes; biocompatibility of human root fragments treated by the new dye in human gingival fibroblasts culture; effectiveness of the new dye in elimination of *S. aureus* and *E. coli*. In the experiments of demineralization and biocompatibility a red laser (660nm, 30mW, 45J/cm², 30s) was applied, while in the microbiology experiments the parameters were changed (660nm, 100mW, 45J/cm², 12s). The statistical analysis were done with parametric and non-parametric tests ($p < 0.05$). The results showed that the new dye promoted demineralization in bovine enamel (surface hardness loss 55.5% and wear 10.33 μ m) and dentin (surface hardness loss 65.9% and wear 8.37 μ m). The demineralization was similar to citric acid and the ideal time of application was 180s. The optic tests showed that the toluidine blue-based new dye (TBOND) diminished the absorption band to 575nm and had a faster photodegradation. The methylene blue-based new dye (MBND) maintained a peak of absorption in 660nm and had a slower photodegradation. Growth of human gingival fibroblasts onto human root surfaces was similar to those treated with regular dyes (3.07 x 2.6 cells after 72h). The TBOND when used alone, reduced *E. coli* and *S. aureus* in 59.6% e 54.6%, respectively. When associated to laser, the reduction of *E. coli* was 52.6%. The MBND associated to laser reduced both bacteria in 100%. In conclusion, the new dye promoted dental demineralization was biocompatible and efficient on eliminating bacteria.

Keywords: Demineralization. Photochemotherapy. Cell culture techniques. Bacteria.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA	18
2.2	AZUL DE METILENO X AZUL DE TOLUIDINA.....	21
2.3	PESQUISAS EM ANIMAIS.....	23
2.4	PESQUISAS EM HUMANOS	24
2.4.1	Revisões sistemáticas com metanálise.....	30
2.5	A IDEIA DO PRESENTE ESTUDO	32
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	EXPERIMENTO 1 – O NOVO CORANTE TEM CAPACIDADE DE DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?.....	41
4.1.1	Preparo dos grupos experimentais	41
4.1.2	Teste de microdureza	43
4.1.3	Perfil de superfície.....	43
4.1.4	Análise estatística	44
4.2	EXPERIMENTO 2 – O TEMPO DE APLICAÇÃO DO NOVO CORANTE INFLUENCIA A DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?.....	45
4.2.1	Análise estatística	45
4.3	EXPERIMENTO 3 – O NOVO CORANTE À BASE DE METILENO OU TOLUIDINA TEM AS MESMAS PROPRIEDADES ÓPTICAS QUE O CONVENCIONAL?	46
4.3.1	Medidas de absorbância do azul de toluidina e do novo corante.....	46
4.3.2	Medidas de fotodegradação do azul de toluidina e do novo corante	46
4.3.3	Medidas de absorbância do azul de metileno e do novo corante	47
4.3.4	Medidas de fotodegradação do azul de metileno e do novo corante.....	47
4.4	EXPERIMENTO 4 – A SUPERFÍCIE DE DENTINA TRATADA PELO NOVO CORANTE É BIOCOMPATÍVEL?.....	48
4.4.1	Cultivo celular.....	49
4.4.2	Análise estatística	50

4.5	EXPERIMENTO 5 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE TOULUIDINA TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?	50
4.5.1	Análise estatística	51
4.6	EXPERIMENTO 6 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE METILENO TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?	51
4.6.1	Análise estatística	52
5	RESULTADOS	53
5.1	EXPERIMENTO 1 – O NOVO CORANTE TEM CAPACIDADE DE DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?.....	55
5.2	EXPERIMENTO 2 – O TEMPO DE APLICAÇÃO DO NOVO CORANTE INFLUENCIA A DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?.....	57
5.3	EXPERIMENTO 3 – O NOVO CORANTE À BASE DE TOLUIDINA E METILENO TEM AS MESMAS PROPRIEDADES ÓPTICAS QUE O CONVENCIONAL?	58
5.3.1	Experimentos com o azul de toluidina	58
5.3.2	Experimentos com o azul de metileno	60
5.4	EXPERIMENTO 4 – A SUPERFÍCIE DE DENTINA TRATADA PELO NOVO CORANTE É BIOCOMPATÍVEL?.....	62
5.5	EXPERIMENTO 5 – O NOVO CORANTE TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?	64
5.6	EXPERIMENTO 6 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE METILENO TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana - (aPDT – antimicrobial photodynamic therapy) - consiste na erradicação de células-alvo por espécies reativas de oxigênio produzidas pela interação de um fotosensibilizador (FS) químico e uma luz de comprimento de onda adequado no máximo espectro de absorção do corante (GÓIS et al., 2010). Entre as espécies reativas de oxigênio geradas estão o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e radical hidroperoxila ($\text{HOO}^\cdot$) (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). Esta explosão oxidativa leva a danos em vários componentes celulares como membrana citoplasmática, proteínas intracelulares, DNA e nucleosídeos, sendo muito eficaz por atingir vários alvos ao mesmo tempo (SHIH; HUANG, 2013). Entre os corantes mais utilizados na aPDT estão os fenotiazínicos como azul de toluidina e metileno. Porém, vários outros fotossensibilizadores têm sido testados como verde malaquita (VILELA et al., 2012), rosa de bengala (GOULART et al., 2010), ftalocianina (KUSSOVSKI et al., 1994), porfirina (GÓIS et al., 2010; NAKONIECZNA; GRINHOLC, 2012), fotoditazina (QUISHIDA et al., 2015) e eritrosina (GOULART et al., 2010) obtendo-se resultados bastante promissores.

As vantagens da aPDT são o uso local, ausência de efeitos sistêmicos, ausência ou mínima possibilidade de resistência bacteriana, uso de moléculas menores e mais permeáveis com melhor capacidade de penetrar em biofilmes em relação aos antibióticos, possibilidade de modificações na fórmula e novas associações para melhoras nas características farmacológicas e fotoquímicas dos fotosensibilizadores.

Em Periodontia, a aPDT tem apresentado resultados interessantes como coadjuvante do tratamento periodontal conservador. Trabalhos *in vitro*, mostram redução significativa de bactérias periodontopatogênicas como *A. actinomicetemcomitans* (GOULART et al., 2010; MATTIELLO et al., 2011; EICK et al., 2013; ALVARENGA et al., 2014), *P. gingivalis* (BRAHAM et al., 2009; EICK et al., 2013), e em biofilmes polimicrobianos colhidos de pacientes com doença periodontal (KLEPAC-CERAJ et al., 2011; EICK et al., 2013). Existe unanimidade na literatura em afirmar que a redução bacteriana em biofilmes é menor que em estado planctônico (FONTANA et al., 2009; GOULART et al., 2010b; TEIXEIRA et al., 2012) e também que o efeito da terapia pode ser diverso em diferentes cepas do mesmo microorganismo (NAKONIECZNA; GRINHOLC, 2012; EICK et al., 2013). Os trabalhos

clínicos ainda são controversos, uns mostrando resultados positivos da aPDT na melhora dos parâmetros clínicos e microbiológicos (SIGUSCH et al., 2010; MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014; PETELIN et al., 2014), redução de mediadores inflamatórios (LUI; CORBET; JIN, 2011; LUCHESI et al., 2013; KOLBE et al., 2014; CAMPANILE et al., 2015) aumento nos fatores de crescimento (SOUZA et al., 2013; FRANCO et al., 2014) e aumento na expressão de genes que regulam a formação óssea (ANDRADE et al., 2013; FRANCO et al., 2014) enquanto outros não mostram melhoras clínicas nem microbiológicas (de OLIVEIRA et al., 2007; POLANSKY et al., 2009; RÜHLING et al., 2010; BALATA et al., 2013; QUEIROZ et al., 2014). No entanto, revisões sistemáticas já mostraram que o uso da aPDT em conjunto com raspagem e alisamento radicular é associado a ganho clínico de inserção e redução na profundidade de sondagem (ATIEH, 2010; SGOLASTRA et al., 2013a; SGOLASTRA et al., 2013b).

A grande maioria dos estudos sobre terapia fotodinâmica em Periodontia, mostra sua associação com o tratamento conservador não cirúrgico. Durante o tratamento cirúrgico periodontal há a necessidade de descontaminação da superfície radicular em contato com a bolsa periodontal ou exposta ao meio bucal, no caso de recobrimentos radiculares. Para otimizar a descontaminação radicular, métodos alternativos, como o condicionamento radicular, através da aplicação de soluções ácidas ou quelantes, foi introduzido para tornar a superfície mais biocompatível através da remoção da camada de *smear layer* produzida pela instrumentação radicular (POLSON et al., 1984; HANES; POLSON, 1989; AMARAL et al., 2011), da abertura dos túbulos dentinários, expondo a matriz colágena e permitindo a união entre as fibrilas expostas da superfície radicular e as fibrilas colágenas do tecido gengival (POLSON; PROYE, 1982), da adesão da fibronectina nos estágios iniciais da cicatrização, inibindo a migração apical do epitélio juncional (POLSON; PROYE, 1983) do favorecimento da quimiotaxia, migração e adesão de fibroblastos (BOYKO; BRUNETTE; MELCHER, 1980; TERRANOVA; MARTIN, 1982), da eliminação de endotoxinas da superfície radicular (FINE, 1980), do efeito antimicrobiano (DALY, 1982) da cementogênese (REGISTER; BURDICK, 1975) e da proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal (SANT'ANA et al., 2007).

Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro em realizar condicionamento ácido de superfícies ósseas. Este procedimento melhorou a adesão, proliferação e área de cobertura por pré-osteoblastos (de REZENDE et al., 2015) e acelerou a consolidação de enxertos em bloco e a formação óssea em animais (REZENDE et al., 2014).

Trabalhos recentes têm procurado melhorar ainda mais os efeitos da terapia fotodinâmica como o uso de novos fotossensibilizadores que geram alta formação de oxigênio singlete como a fotoditazina (QUISHIDA et al., 2015) e derivados de fenaleno (SPÄTH et al., 2014) uma vez que não foi relatada a existência de resistência bacteriana ao oxigênio singlete. Outros autores associaram o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao azul de metileno aumentando a morte bacteriana, principalmente de Gram negativas que são mais resistentes à aPDT devido a sua parede celular (GARCEZ et al., 2011). O uso de nanopartículas de carga positiva carregadas com fotossensibilizadores facilitou a entrada do corante em biofilmes e aumentou sua fototoxicidade (KLEPAC-CERAJ et al., 2011) e em um estudo clínico, diminuiu o número de células apresentadoras de antígeno e aumentou a produção de colágeno nos tecidos gengivais (SÉGUIER et al., 2010). O uso de inibidores de bombas de efluxo bacteriano – fator de resistência bacteriana a drogas – pode potencializar o efeito da terapia fotodinâmica (TEGOS et al., 2008), bem como a aplicação simultânea de dois fotossensibilizadores de diferentes origens como porfirinas e azul de toluidina (NAKONIECZNA; GRINHOLC, 2012).

Não há na literatura trabalhos propondo o uso de corantes com pH ácido a fim de associar o efeito bactericida da aPDT ao efeito de desmineralização superficial da raiz promovida por ácidos, comumente utilizados em cirurgia periodontal. Os trabalhos sequer citam qual o pH dos fotossensibilizadores utilizados. A possibilidade de biomodificação radicular por corantes de terapia fotodinâmica foi descrita apenas por trabalhos de nosso grupo de pesquisa (DAMANTE et al., 2013; DUCATI et al., 2013; KARAM, 2013, FERREIRA et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diversas nomenclaturas existem na literatura para a terapia fotodinâmica como: quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana, desinfecção fotoativada, fotossensibilização letal, inativação fotodinâmica, inativação fotodinâmica de bactérias patogênicas, terapia fotodinâmica antimicrobiana e ação fotodinâmica (KÖMERIK; WILSON; POOLE, 2000; BONSTEIN et al., 2010; GOIS et al., 2010; ARENAS et al., 2013). Gois et al. (2010) afirmaram ser o termo terapia fotodinâmica (aPDT) voltado para uso em lesões carcinomatosas, sendo que quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana seria o termo mais adequado para eliminação de microorganismos. Devido à existência de tantos termos e mudanças constantes na nomenclatura optou-se, utilizar o termo terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no presente trabalho, e no qual, será abordado apenas o uso da aPDT como terapia antimicrobiana para uso em Periodontia.

Uma revisão publicada recentemente por nosso grupo de pesquisa (PASSANEZI et al., 2015) mostrou que a terapia fotodinâmica em Periodontia parece ser uma alternativa terapêutica promissora. Há a redução de bactérias em biofilmes bucais e sobre implantes, sendo que, no tratamento periodontal, é rotineiro desagregar o biofilme através de raspagem e alisamento radicular, otimizando o efeito de fototoxicidade da aPDT. Existe a possibilidade de bons resultados em pacientes imunossuprimidos, evitando-se os efeitos colaterais sistêmicos provocados por medicamentos. A maior dificuldade ainda, é a padronização dos parâmetros de irradiação, tipo de laser e corante utilizados, tempo de pré-irradiação, entre outros.

A resistência bacteriana aos antibióticos é uma consequência de seu uso inadequado e excessivo na agricultura, pecuária e agentes de limpeza. Mesmo na área da saúde há um uso indiscriminado, muitas vezes com prescrição inadequada. Além disso, no Brasil há o costume de automedicação da população (SEKIGUCHI et al., 2007). Nesse sentido, um maior uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana diminuiria a necessidade dos antibióticos que podem causar problemas gastrointestinais, alergias, adsorção de tetraciclina em dentes e ossos, intolerância ao álcool além de uma redução da microbiota indígena. Uma das grandes vantagens da aPDT é o efeito local, que em Periodontia limita-se às bolsas periodontais, defeitos ósseos ou implantes contaminados. Utiliza-se um produto de baixíssima toxicidade para os tecidos adjacentes, com efeito letal localizado, protegendo as espécies bacterianas

indígenas (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). Por todas essas vantagens, pesquisas com PTD são encorajadas e a busca por fotossensibilizadores e terapias mais efetivas tem aumentado.

Hoje, ao se realizar uma busca rápida com as palavras-chave “Photodynamic therapy periodontitis” no Pubmed, ela resulta em cerca de 130 artigos do ano 2000 a 2015. Existem vários grupos de pesquisadores ao redor do mundo pesquisando aPDT no tratamento periodontal, e em sua maioria, mostrando relatos de algum efeito positivo adicional, o que sugere uma tendência de crédito à terapia por parte da comunidade científica. E ainda, de forma surpreendente, cerca de metade dos trabalhos clínicos e em animais é de grupos de pesquisadores brasileiros, como mostra o Quadro 1. Interessante também, é o grande número de ensaios clínicos publicados nos últimos 3 anos (cerca de 70%).

Quadro 1 - Seleção de pesquisas em animais e humanos, via Pubmed com as palavras-chave “Photodynamic therapy periodontitis”

	Animais (17 estudos)	Humanos (45 estudos)
Brasileiros	13	18
Estrangeiros	4	27
Mencionam algum resultado positivo da aPDT	14	27
Sem resultado adicional da aPDT	3	18

2.1 MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A primeira descrição da inativação de microorganismos por luz e corantes foi há 100 anos por Oscar Raab, quando notou a morte de paramécios em contato com acridina e luz. A terapia fotodinâmica consiste no uso de fotossensibilizadores (FS) que absorvem luz de comprimento de onda adequados e geram reações químicas que podem destruir células e microorganismos (SOUKOS; GOODSON, 2011).

As vantagens da aPDT são: baixo risco, uso de corantes não tóxicos, possibilidade de ser repetida diversas vezes sem efeito tóxico cumulativo, efeito local, ausência de efeitos sistêmicos e colaterais, ação simultânea contra vários microorganismos como vírus, bactérias e fungos. Outra grande vantagem é que as bactérias não possuem a mesma habilidade de eliminar compostos reativos de oxigênio como as células eucarióticas, fazendo com que a terapia destrua bactérias sem atingir as células do hospedeiro ao redor (BRAHAM et al.,

2009). E ainda, as moléculas envolvidas na aPDT são muito menores que as dos antibióticos convencionais, sendo assim, mais permeáveis e com capacidade de passar pelos canais aquosos do biofilme (FONTANA et al., 2009).

Vários FS orgânicos possuem potencial para eliminar microorganismos, entre eles os xantenos alogenados como rosa de bengala, fenotiazinas como azul de toluidina O e metileno, macrolídeos conjugados como a acridina, e ainda, ftalocianinas, porfirinas e produtos naturais. (ARENAS et al., 2013).

Os FS reagem com moléculas próximas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a dois tipos de reação química:

Reação do tipo I – há transferência de cargas para o oxigênio formando radicais de oxigênio como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e radical hidroperoxila ($HOO^\cdot$). Essa é a reação mais encontrada nos corantes fenotiazínicos como azul de metileno, toluidina e cloreto de fenotiazina (SPÄTH et al., 2014). Esses FS possuem pico de absorção do espectro vermelho da luz, sendo o metileno na banda de 664nm e toluidina 630nm.

Reação do tipo II – há transferência de energia formando o oxigênio singleto (1O_2) que é altamente citotóxico podendo oxidar várias moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Ao danificar os lipídeos da membrana celular bacteriana, há a liberação de espécies reativas de oxigênio que interagem com vários alvos intracelulares, tornando difícil a resistência contra essa terapia (PERUSSI, 2007). Sua ação é rápida (0,04 μ s) com um raio de 100nm. Essa reação ocorre em maior magnitude com os FS fotoditazina (QUISHIDA et al., 2015) e derivados de fenaleno (SPÄTH et al., 2014). Alguns autores comprovaram a ocorrência de formação de oxigênio singleto nas reações com o azul de metileno (CAETANO et al., 2007; ARENAS et al., 2013), porém em menor escala que os FS acima citados.

Existe muita variabilidade entre os estudos, pois o sucesso da terapia depende de vários fatores como tipo de FS, tempo de ação, localização, viabilidade de oxigênio, comprimento de onda, fluência e densidade de energia do laser (SOUKOS; GOODSON, 2011). Isso torna extremamente difícil comparar estudos e realizar revisões sistemáticas com metanálise.

A maioria dos trabalhos descreve uso dos corantes azul de metileno, toluidina O e cloreto de fenotiazina, sendo que alguns produtos são comercializados. O Periowave® (Ondine Biopharma – Canadá) é a base de azul de metileno. O kit da Helbo® (Photodynamic

Systems GmbH – Austria) utiliza cloreto de fenotiazina. No Brasil, existe o Chimiolux® (DMC – São Carlos) à base de azul de metileno nas concentrações de 0,005% (Chimiolux 5) e 0,01% (Chimiolux 10). Existe a possibilidade também, de o corante ser preparado em farmácias de manipulação.

O efeito da aPDT em bactérias é bem variado. As Gram positivas são mais susceptíveis por possuírem uma camada mais porosa de peptidoglicanos e lipoproteínas enquanto que as Gram negativas possuem maior resistência devido à sua parede celular complexa com duas bicamadas lipídicas. A hidrofobicidade e as cargas dos corantes geram interações diferentes com as organelas bacterianas. Um corante com carga positiva reage com as mitocôndrias, enquanto que um de carga negativa pode reagir com a membrana celular de um mesmo tipo de bactéria.

Embora alguns autores afirmem que não há resistência bacteriana à aPDT (GOIS et al., 2010), Shih e Huang (2013) demonstraram resistência de *Pseudomonas aeruginosa* à aPDT com metileno. Uma cepa ficou mais resistente, após 10 repetições da terapia, através de mudança nas proteínas da membrana externa. Outros autores citam a capacidade de expelir azul de metileno pelas bombas de efluxo bacteriano, um mecanismo conhecido de resistência bacteriana a várias drogas (TEGOS et al., 2008; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). Porém, existe unanimidade em afirmar que não existe resistência bacteriana ao oxigênio singlete (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013; SPÄTH et al., 2014).

Existem novidades na área de fotossensibilização, como uma escova de dentes com LED (BriteBrush, EUA). Seu desenvolvimento foi baseado no artigo de Soukos et al. (2005), o qual mostrou que a irradiação por lâmpadas de halogeneto de metal, nos espectros entre 380 a 520nm foi capaz de eliminar bactérias pigmentadas de preto como *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogênica* (redução 70%), *P. gingivalis* (77%) na ausência de um FS. Os picos de irradiação ocorreram em 435nm, compatível com o espectro azul. A luz azul interage com as porfirinas endógenas dessas bactérias, principalmente a *P. intermedia*. Um ensaio clínico randomizado foi realizado (JUNG et al., 2014) para avaliar o efeito da escovação (3x/dia) com a escova de LED (iBrush, EUA) em comparação com a escovas sem LED. O LED emite em 635nm (vermelho) com 13mW/cm², simultaneamente à vibração da escova. A escovação foi realizada 3 vezes ao dia, por 3 minutos, durante 1 mês. Reduções na PS 0,76mm e NCI 0,90mm foram obtidas para o grupo teste. Não houve diferenças no exame microbiológico. Devemos analisar com cautela esses resultados uma vez que a PS inicial média dos pacientes era apenas de 2,8mm. As reduções encontradas talvez não tenham

significância clínica e deve-se levar em conta o fator “placebo” de se usar uma escova com LED. Nesse caso, também, pode ter ocorrido a fototerapia que é comum no espectro vermelho em vez da fotossensibilização (azul) para eliminar bactérias.

2.2 AZUL DE METILENO X AZUL DE TOLUIDINA

Os corantes fenotiazínicos são utilizados em medicina há muitos anos para tratamento oncológico, testes de diferenciação celular e coloração para microscopia. Os corantes azuis são efetivos em sistemas biológicos, pois absorvem radiação vermelha e não sofrem interferência de pigmentos endógenos como hemoglobina e melanina. Por estarem na janela terapêutica (entre 600 e 900nm) também não sofrem interferência pela água (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). Ambos possuem estruturas químicas muito semelhantes, porém, com diferenças importantes na fotodestruição provocada (BLÁZQUEZ-CASTRO et al., 2009). O metileno é hidrofílico e tem picos de absorção nas bandas de 660nm, enquanto que o toluidina menos hidrofílico e tem picos de absorção nas bandas de 630nm (USACHEVA et al., 2006). O azul de toluidina pode sofrer interferência de alguns derivados da hemoglobina (grupo heme) que possuem fraca absorção em 630nm (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Esses corantes costumam ser muito seguros, tanto que são utilizados em medicina para terapia fotodinâmica antitumoral. Estudos sobre citotoxicidade dos corantes em cultura de células mostraram que neutrófilos mantiveram sua viabilidade alta quando tratados com FS como azul de metileno e toluidina. Já outros corantes como eritrosina, rosa de bengala, cristal violeta, causaram redução de sua viabilidade e alterações estruturais (TANAKA et al., 2012).

Os corantes azuis são metacromáticos, formam complexos em presença de ânions, quando há aumento da concentração e outras reações, mudando seu espectro de absorção devido a alterações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o corante e as moléculas adjacentes. Isso resulta em agregação do corante, muitas vezes na forma de dímeros (NÚÑEZ, 2007). Os dímeros têm picos de absorção reduzidos, geralmente 610nm para o metileno e 590nm para o toluidina. Esses dímeros mostram uma eficiência fotodinâmica maior, e idealmente, a fonte de luz deveria cobrir ambos os espectros, o que se consegue com o LED. Os monômeros de metileno formam preferencialmente o oxigênio singlete, enquanto que os dímeros formam espécies reativas de oxigênio.

Ambos os corantes formam complexos metacromáticos com lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, porém o azul de toluidina forma agregados maiores na superfície dos LPS causando maior fotodestruição. Algumas bactérias como a *E. coli* possuem porinas seletivas de cátions que irão atrair corantes mais hidrofílicos como o metileno. Nesse caso, a morte bacteriana é via porinas e não LPS. O mecanismo de morte celular por azul de toluidina seria mais por ligação com LPS da superfície bacteriana e o de metileno via integração com proteínas de membrana como as porinas (USACHEVA et al., 2006).

O azul de metileno liga-se ao DNA nas bases G-C intercalando-se nos pares de bases. Também pode oxidar diversos aminoácidos como triptofano, tirosina, histidina, metionina e cisteína através de reações do tipo I e II. Algumas organelas como os ribossomos bacterianos podem ser inativados por esse corante, bem como as proteínas, fosfolipídeos e colesterol das membranas celulares (GARCEZ et al., 2011). Também, liga-se às mitocôndrias gerando morte celular por apoptose. Porém, é incorporado de forma mais lenta nas células em relação ao azul de toluidina.

O artigo de Blázquez-Castro et al. (2009) explica os mecanismos de ação dos corantes azuis. O mecanismo de entrada do metileno e toluidina nas células parece ser em sua leuco forma que não reage com a luz. Ocorre uma reação na face externa da membrana plasmática com uma redutase (NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1) transformando-os em sua forma leuco. Assim, os corantes entram na célula por difusão, pela característica das leuco formas serem mais lipofílicas e não possuírem carga. Uma vez dentro das células, as leuco formas são re-oxidadas, sendo os dois corantes capazes de alternar as duas formas gerando espécies reativas de oxigênio dentro da célula. O azul de toluidina facilmente alterna entre a forma leuco e a colorida sendo mais citotóxico. Quando a luz é aplicada, há mais corante na forma colorida dentro da célula e quanto mais espécies reativas de oxigênio são formadas, mais moléculas leuco são transformadas em coloridas criando um ciclo de reforço positivo. A forma leuco do metileno não é re-oxidada tão facilmente, portanto, no momento da aplicação de luz, há muitas formas leuco dentro da célula que não irão reagir fotoquimicamente. Vale a pena ressaltar que esse artigo se refere ao efeito desses corantes em células epiteliais em cultura e não em bactérias. Talvez em bactérias os mecanismos sejam um pouco diversos. Talvez o tempo de pré-irradiação do metileno deva ser um pouco maior para permitir as reações de oxidação intracelulares.

Um estudo em ratos comparou concentrações diferentes de metileno e toluidina (10mg/ml e 100µg/ml) e laser 660nm, sendo que as concentrações mais baixas dos dois

corantes foram suficientes para promover menor perda óssea e diminuição de fatores indutores de osteoclasia (RANK) (GARCIA et al., 2014). Estudos *in vitro* mostraram que um dos mecanismos de ação dos corantes fenotiazínicos é gerar uma diminuição do ATP intracelular e aumento do ATP extracelular e a concentração do corante deve ser 2 a 4x maior para matar bactérias Gram negativas (ROMANOVA et al., 2003).

2.3 PESQUISAS EM ANIMAIS

Os estudos em animais, de maneira geral, mostram resultados bastante positivos do uso da aPDT como coadjuvante da raspagem e alisamento radicular.

Ratos inoculados com *P. gingivalis* e *A.a.*, tratados com toluidina (e laser 630nm) e metileno (e laser 660nm), mostraram significante redução bacteriana e menor perda óssea histológica com aPDT associado à raspagem (KÖMERIK et al., 2003; PRATES et al., 2013). Os autores sugeriram que essa melhora é devido ao efeito antimicrobiano adicional provocado pela terapia. Contrariamente a esses resultados, Qin et al. (2008) não encontraram efeito adicional da aPDT com toluidina e laser 630nm. Nesse trabalho, a doença periodontal desenvolveu naturalmente em 6 semanas após instalação de ligaduras. Os autores relataram ausência de danos teciduais.

Outra série de estudos procurou investigar o efeito da aPDT no tratamento periodontal de animais imunossuprimidos (FERNANDES et al., 2010), lesões de furca em ratos diabéticos (de ALMEIDA et al., 2008), ratas ovariectomizadas (GARCIA et al., 2013), e expostos à nicotina (GARCIA et al., 2011) - tratados por PDT com toluidina e laser 660nm. Os resultados mostraram menos perda óssea histológica do que os grupos tratados apenas com raspagem.

Um estudo em cães, não mostrou resultados com a aPDT com o FS clorina associado ao laser de 662nm. A doença periodontal foi induzida de forma natural após instalação de ligaduras, foram coletadas medidas clínicas e fluido gengival para detecção de IL-1beta e TNF-alfa. Não houve diferença entre os grupos tratados por aPDT, raspagem somente, laser somente e corante somente (SORKHDINI et al., 2013). Contrariamente a esses resultados, outro estudo em cães utilizando o kit Helbo® (cloreto de fenotiazina e laser 660nm) mostrou redução significativa de periodontopatógenos após uma semana de terapia e com valores

significativos para o *A. actinomicetemcomitans*, porém sem diferenças clínicas (de OLIVEIRA et al., 2011).

Os estudos em animais são válidos por nos permitir avaliar histologicamente o efeito da aPDT nos tecidos, o que por motivos éticos não pode ser realizado em humanos. Também permitem o desenvolvimento laboratorial de doenças imunossupressoras ou alterações genéticas. A grande limitação nos estudos com ratos, é que a doença periodontal costuma ser desenvolvida de forma muito rápida – 7 a 14 dias em alguns trabalhos (PRATES et al., 2011) – através de ligaduras e inoculação de uma ou outra espécie de periodontopatógeno. Além disso, esses animais possuem um metabolismo acelerado tendo uma reparação tecidual bem rápida. Já em cães, a doença periodontal desenvolve-se naturalmente após a instalação de ligaduras (SORKHDINI et al., 2013), apresentando um biofilme polimicrobiano mais organizado. O tamanho maior dos cães também facilita o trabalho e instrumentação periodontal. Porém, por motivos éticos, está cada vez mais difícil conseguir permissão para realizar trabalhos nesses animais.

2.4 PESQUISAS EM HUMANOS

Os trabalhos em humanos, tem mostrado, em sua maioria, bons resultados da aPDT em conjunto com a raspagem e alisamento radicular no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal. O Quadro 2 mostra um resumo de todos os trabalhos encontrados na busca citada no início dessa revisão de literatura, para comparação das metodologias e uma visão global dos resultados. Conforme mencionado anteriormente, houve publicação de um grande número de ensaios clínicos randomizados nos últimos 3 anos.

Quadro 2 - Ensaios clínicos que avaliaram o uso da terapia fotodinâmica como coadjuvante da raspagem e alisamento radicular no tratamento periodontal. Busca PUBMED com palavras-chave “Photodynamic therapy periodontitis”

Autores	Desenho	n	Doença	laser	dosimetria	corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados
DE OLIVEIRA et al., 2007	Boca dividida	10	DP agressiva	660	60mW/cm ² , 10s	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem diferenças clínicas
BRAUN et al., 2008	Boca dividida	20	DP crônica	660	100mW	HELBO	x	3min	única	melhora PS e NCI (3m), SS (3m) diminuição do fluido gengival
CHRISTOULIDES et al., 2008	Paralelo	24	DP crônica	670	75mW, 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	redução SS
AL-ZAHRANI et al., 2009	Paralelo	45	Diabetes	670	60s	MB Periowave	0,01%	5-10s	única	sem diferença clínica comparado a doxiciclina
CHONDROS et al., 2009	Paralelo	24	Manutenção (bolsas ≥ 4mm)	670	75mW/cm ² , 60s	HELBO	10mg/ml	x	única	redução: SS(3 e 6m), Fn., En. (3m) E.c.; C.s.(6m)
DE OLIVEIRA et al., 2009	Boca dividida	10	DP agressiva	660	60mW/cm ² , 10s	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem mudanças TNFα e RANKL
LULIC et al., 2009	Paralelo	10	Manutenção	670	75mW/cm ² , 1min	HELBO	10mg/ml	3min	5x em 2 semanas	reduziu parâmetros clínicos (até 6m)
POLANSKY et al., 2009	Paralelo	58	DP crônica	680	75mW, 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	sem diferença clínica e microbiológica
PINHEIRO et al., 2010	Boca dividida	10	DP crônica	632,8	4J/cm ² , 60s	50% TBO (0,005%) + 50% endo PTC	50%	3min	única	redução microbiológica
RÜHLING et al., 2010	Paralelo	54	Bolsas residuais	635	100mW, 1min	TBO	5%	30s	única	sem diferenças clínicas e microbiológicas
SÉGUIER et al., 2010	Boca dividida	16	DP crônica	670	0,5W/cm ² , 12,7J/cm ² , 40s	Ftalocianina	x	3x de 5 min	única	redução céls. Apresent. de antígeno, aumento fibras colágenas
SIGUSCH et al., 2010	Paralelo	24	DP crônica com F.n.	660	60mW/cm ² , 1min	HELBO	10mg/ml	1min	única BT + língua	melhora nos parâmetros clínicos e redução <i>F. nucleatum</i>
GE et al., 2011	Paralelo	58	DP crônica	670	140mW, 60s, 6J, 21J/cm ²	MB	0,01%	30s	única	redução SS (princip. Bolsas ≥ 5mm)
LUI; CORBET; JIN, 2011	Boca dividida	24	DP crônica	940	5W, pulsado, 30s	MB	1%	3min	única	redução PS, SS, fluido gengival, IL-1β (1m)
BERAKDAR et al., 2012	Boca dividida	22	DP crônica	670	150mW, 60s	MB Periowave	0,005%	x	única	redução PS (6m)
CAPPUYNS et al., 2012	Boca dividida	32	Bolsas residuais	660	40mW	HELBO	10mg/ml	1min	única	sem diferença clínica e microbiológica
GIANNELLI et al., 2012	Boca dividida	26	DP crônica	635	100mW, 1 min	MB	0,3%	5min	4 a 10 vezes	melhor PS, SS, NCI, espiroquetas (12m)
GIANNOPOULOU et al., 2012	Boca dividida	32	Bolsas residuais	660	100mW, 3J/cm ² , 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	sem diferenças nas citocinas de fase aguda

continua

continuação

Autores	Desenho	n	Doença	laser	dosimetria	corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados
NORO FILHO et al., 2012	Boca dividida	12	HIV	660	0,03W, 0,428W/cm ² , 57,14J/cm ² , 133s	MB Chimiolux	0,01%	5min	única	Melhoras em PS, NCI, (6m) sem diferença microb.
NOVAES et al., 2012	Boca dividida	10	DP Agressiva	660	0,06W, 10s, 212,23J/cm ²	HELBO	10mg/ml	1min	única	redução de Aa., raspagem reduziu complexo vermelho
THEODORO et al., 2012	Boca dividida	33	DP crônica	660	30mW, 150s, 4,5J, 0,4W/cm ² , 64,28J/cm ²	TBO	100µg/ml	1min	única	sem diferença clínica, redução microbiológica (180d)
ANDRADE et al., 2013	Boca dividida	15	Furca classe III	660	60mW/cm ² , 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Regulação de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL
BALATA et al., 2013	Boca dividida	22	DP severa	660	100mW, 9J, 90s, 320J/cm ²	MB	0,00 5%	2min	única	sem diferenças clínicas
BASSIR et al., 2013	Boca dividida	16	DP crônica	LED 628	2W/cm ² , 10s	TBO	0,1mg/ml	3min	única	sem diferenças clínicas
CAMPOS et al., 2013	Boca dividida	13	Bolsas residuais	660	60mW, 129J/cm ²	MB	10mg/ml	1 min	única	Redução PS, ganho NCI (3m)
DILSIZ; CANAKCI; AYDIN, 2013	Boca dividida	24	DP crônica	808	100mW, 6J, 60s	MB	1%	3min	única	aPDT pior que o laser de alta (KTP)
LUCHESI et al., 2013	Paralelo	37	Furca classe II	660	60mW/cm ² , 129J/cm ² , 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Sem diferença clínica, Redução Pg. Tf. E citocinas (6m)
SOUZA et al., 2013	Boca dividida	15	Furca classe III	660	60mW/cm ² , 1min	HELBO	10mg/ml	1min	única	aumento TGFβ e volume fluido gengival
ARWEILER et al., 2014	Paralelo	36	Agressiva	660	1min.	HELBO	10mg/ml	3min	única	aPDT x antibiótico = antibiótico melhores resultados
BETSY et al., 2014	Paralelo	88	DP crônica	655	1W, 60mW/cm ² , 60s	MB	10mg/ml	3min	única	Melhoras PS e NCI em 3 e 6m. Redução SS
CHITSAZI et al., 2014	Boca dividida	24	DP agressiva	670	75mW, 2min.	TBO	x	1min	única	SS melhor, sem diferenças microbiológicas
FRANCO et al., 2014	Boca dividida	15	DP severa	660	60mW/cm ² , 90s, 5,4Jcm ²	MB	0,01%	5min	4x - 1x/semana	melhora SS, aumento RANK/OPG e FGF2
KOLBE et al., 2014	Boca dividida	22	Bolsas residuais	660	60mW, 129J/cm ² , 1min	MB	10mg/ml	1min	única	Redução SS (6m), Redução Pg. Aa., melhora nas citocinas
MACEDO et al., 2014	Paralelo	30	Crônica/ diabetes	660	60mW, 28mW/cm ² , 1min, 16,72J/cm ²	Cloreto fenotiazina	10mg/ml	1min	única	Sem diferenças clínicas, redução HbA1c
MONGARDINI; DI TANNA; PILLONI, 2014	Boca dividida	30	Crônica - manutenção	LED 628	1W, 2W/cm ² , 20J/cm ² , 10s	TBO	0,1mg/ml	1min	única	redução PS e bactérias complexo vermelho
MOREIRA et al., 2014	Boca dividida	20	DP agressiva	670	0,25W/cm ² , 75mW, 2,49J/cm ² , 10s	HELBO	10mg/ml	1min	4x - 2, 7, 14 d.	melhor PS e NCI (90d) Sem diferenças microbiológicas
PETELIN et al., 2014	Paralelo	27	DP crônica	660	60mW/cm ² , 1min	HELBO	10mg/ml	3min	única	Redução SS (3 e 12m), Aa., Td., Tf.
POURABBAS et al., 2014	Boca dividida	24	DP crônica	638	8 a 10J/cm ² , 120s	TBO	x	1min	única	sem diferenças clínicas, redução de TNF-alfa

continua

conclusão

Autores	Desenho	n	Doença	laser	dosimetria	corante	Concentração	Tempo PI	Frequência aPDT	Principais resultados
QUEIROZ et al., 2014	Boca dividida	20	Fumantes DP crônica	660	60mW/cm ²	HELBO	10mg/ml	1 min	única	sem diferenças clínicas
ALWAELI, KHATEEB, AL-SADI, 2015	Boca dividida	16	DP crônica	660	100mW, 1min	HELBO	10mg/ml	1 a 3min	única	melhora PS e NCI após 12 meses
CAMPANILE et al., 2015	Paralelo	28	Bolsas residuais	670	60s	MB Periowave	x	1 min	2x/semana	Redução PS, SS, bolsas, proteína C reativa, sem diferenças microbiol.
QUEIROZ et al., 2015	Boca dividida	23	DP crônica/fumantes	660	60mW, 28mW/cm ² , 1min, 16,72J/cm ²	HELBO	10mg/ml	1 min	única	Sem diferença clínica, redução de IL-1 β e MMP-8

PS= profundidade de sondagem; **NCI**= nível clínico de inserção; **SS**= sangramento à sondagem; **DP**= doença periodontal; **Aa.**= *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*; **Fn.**= *Fusobacterium nucleatum*; **En.**= *Eubacterium nodatum*; **Pg**= *Porphyromonas gingivalis*; **E.c.**= *Eikenella corrodens*; **C.s.**= *Capnocytophaga* sp.; **m**= meses; **d**= dias; **TBO**= azul de toluidina O; **MB**= Azul de metileno; **PI**= pré-irradiação.

A maior parte dos artigos mostra a aplicação da aPDT no tratamento da periodontite crônica ou de bolsas residuais em pacientes em terapia de manutenção (Quadro 2), bem como o uso do azul de metileno como FS associado ao laser de 660-670nm, que é o máximo espectro de absorção desse corante. Poucos utilizaram o azul de toluidina, sendo que algumas pesquisas o associaram ao laser de 630nm que é o seu espectro de absorção ideal (PINHEIRO et al., 2010; RÜHLING et al., 2010; POURRABAS et al., 2014) e não obtiveram diferenças clínicas significantes. Houve apenas redução microbiológica e de citocinas inflamatórias. Já outras pesquisas o associaram com o laser de 660nm (THEODORO et al., 2012; CHITSAZI et al., 2014) obtendo redução no sangramento à sondagem ou microbiológica. Bassir et al. (2013) e Mongardini, Di Tanna e Pilloni (2014) utilizaram o LED de 628nm em conjunto com o azul de toluidina, sendo que o primeiro obteve resultados positivos na redução da profundidade de sondagem e de bactérias do complexo vermelho e o segundo não obteve diferenças clínicas.

Algumas pesquisas focaram no tratamento de lesões de furca por aPDT. Luchesi et al. (2013) realizaram um estudo paralelo em 37 pacientes com lesões de furca classe II. A aPDT não mostrou diferenças clínicas do grupo raspado, porém houve redução de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e citocinas inflamatórias após 6 meses. Esse resultado mostra que há a possibilidade de um efeito adicional da aPDT também na terapia cirúrgica. Isso foi mostrado por Andrade et al. (2013) e Souza et al. (2013) em furcas de classe III de dentes que seriam extraídos. Após raspagem + aPDT, e cirurgia + aPDT, houve uma regulação positiva na expressão de TIMP-2/MMP-2 e OPG/RANKL responsáveis pela remodelação óssea e aumento de fatores de crescimento como o TGF β .

Existem poucos ensaios clínicos avaliando o tratamento de periodontite agressiva por meio da aPDT (de OLIVEIRA et al., 2007; de OLIVEIRA et al., 2009; NOVAES et al., 2012; ARWEILER et al., 2014; CHITSAZI et al., 2014; MOREIRA et al., 2014). Alguns não obtiveram diferenças clínicas e nem em mediadores inflamatórios (de OLIVEIRA et al., 2007; de OLIVEIRA et al., 2009). Arweiler et al. (2014), compararam o efeito da raspagem associada à aPDT ou antibióticos com o intuito de verificar a possibilidade de substituição dos medicamentos pela terapia, porém, o efeito do antibiótico nos parâmetros clínicos foi melhor (ARWEILER et al., 2014). Outras pesquisas mostraram resultados positivos da aPDT na redução bacteriana (NOVAES et al., 2012; MOREIRA et al., 2014), principalmente do *A. actinomycetemcomitans*. Chitsazi et al. (2014) obtiveram redução apenas no sangramento à sondagem com a aPDT. O sangramento à sondagem é um bom indicador de atividade da

doença periodontal, portanto esse resultado não deve ser menosprezado. Os melhores resultados foram do trabalho de Moreira et al. (2014), mostrando redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção até 90 dias pós-terapia, e ainda, uma redução bacteriana significativa. Um fator que contribuiu para o sucesso do tratamento foi uma terapia de manutenção rigorosa com profilaxia a cada 15 dias por 3 meses. Além disso, a raspagem boca toda foi feita em 48h e a terapia fotodinâmica foi aplicada em sessões múltiplas após 2, 7 e 14 dias da raspagem.

As sessões múltiplas parecem promover melhores resultados clínicos, porém, poucas pesquisas as utilizam (GIANNELLI et al., 2012; FRANCO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; CAMPANILE et al., 2015). No tratamento de bolsas residuais, a aPDT (duas vezes na semana) promoveu redução na profundidade de sondagem, na dosagem de proteína C reativa após 3 meses e também resultou em ausência de bolsa residual. Porém, não foram observadas diferenças microbiológicas (CAMPANILE et al., 2015). No artigo de Lulic et al. (2009), pacientes em manutenção foram beneficiados pela aPDT repetida por 5 vezes dentro de duas semanas. Houve redução nos parâmetros clínicos por 6 meses. No tratamento de periodontite crônica a aplicação da aPDT (1 vez por semana – total 4 a 10 sessões) mostrou melhora de todos os parâmetros clínicos e redução de espiroquetas após um ano. A particularidade dessa pesquisa é que houve a combinação da aplicação de um laser de alta intensidade para remoção de todo epitélio sulcular, da bolsa e gengival previamente à aPDT (GIANNELLI et al., 2012). Além da melhora em parâmetros clínicos, 4 sessões de aPDT (1 vez por semana), resultaram em modulação da expressão de genes RANK/OPG responsáveis pela diminuição da osteoclastogênese e aumento de fatores de crescimento como o FGF2, envolvido na reparação (FRANCO et al., 2014). Outro fato digno de nota é que, nesses dois últimos trabalhos citados, o tempo de pré-irradiação do corante foi de 5 minutos e não de 1 minuto como a maioria encontrada na literatura. Portanto, o aumento do tempo de pré-irradiação e sessões múltiplas de aPDT parecem beneficiar os resultados.

Poucos trabalhos verificaram o efeito adicional da aPDT em pacientes fumantes ou com doenças sistêmicas. Em pacientes diabéticos a terapia foi comparada ou usada em conjunto com antibióticos resultando em não melhora dos parâmetros clínicos e redução da hemoglobina glicosilada no grupo que usou antibiótico (AL-ZAHRANI et al., 2009; MACEDO et al., 2014). Em fumantes, a terapia pareceu não melhorar os parâmetros clínicos, porém encontrou-se uma redução na IL-1 β e MMP-8 (QUEIROZ et al., 2014, 2015). Noro Filho et al. (2012) mostraram efeito benéfico da aPDT em pacientes com HIV. Houve

melhora nos parâmetros clínicos até 6 meses, porém sem diferenças microbiológicas para a raspagem. Vale a pena ressaltar que nesse estudo o tempo de pré-irradiação do corante foi de 5 minutos.

O desenho experimental de boca dividida é o mais comum nos trabalhos publicados com a inclusão desde apenas 10 pacientes (LULIC et al., 2009; PINHEIRO et al., 2010) até 33 pacientes (THEODORO et al., 2012). Os trabalhos de desenho paralelo com o maior número de pacientes foram os de Ge et al. (2011); Polansky et al. (2009); Rühling et al. (2010) e Betsy et al. (2014) com recrutamento de 58, 54, 58 e 88 pacientes, respectivamente. Os dois primeiros não encontraram diferenças clínicas e microbiológicas. Ge et al. (2011) mostraram redução no sangramento à sondagem no grupo que recebeu aPDT. Os melhores resultados foram obtidos no estudo com a maior população obtendo-se redução em todos os parâmetros clínicos por 6 meses (BETSY et al., 2014). Destaca-se que o tempo de pré-irradiação nessa pesquisa foi de 3 minutos. Sgolastra et al. (2013b), em sua revisão sistemática, sugeriram que mais estudos paralelos deveriam ser realizados para dar mais credibilidade ao sucesso da terapia.

2.4.1 Revisões sistemáticas com metanálise

Existem algumas revisões sistemáticas na literatura que tiveram por objetivo avaliar os efeitos da aPDT como complemento à raspagem e alisamento radicular, sendo os resultados conflitantes.

Na revisão de Atieh (2010), foram incluídos apenas 4 artigos. O autor considerou 3 semanas de acompanhamento pós-terapia para sua análise e mostrou ganhos de inserção de 0,29mm e redução na profundidade de sondagem de 0,11mm. Sua conclusão foi positiva em relação ao uso da terapia, porém alertou para o fato da inclusão de poucos estudos.

Azarpazhooh et al. (2010), incluíram 5 trabalhos em sua revisão, sendo 3 deles iguais aos escolhidos na revisão acima citada. Trabalhos de 3 e 6 meses de acompanhamento foram considerados. Apesar de terem obtido 0,34mm de ganho de inserção clínica e 0,25mm de redução na profundidade de sondagem, os autores não consideraram a terapia superior à raspagem somente. Um grande viés dessa revisão foi misturar diferentes tipos de doença periodontal na mesma análise.

Outra revisão onde os autores apontaram falta de evidências científicas para uso da aPDT em conjunto com a raspagem foi a de Sgolastra et al. (2013a). Os autores avaliaram 7 artigos, incluindo acompanhamentos de 3 e 6 meses. Aos 3 meses, houve redução na profundidade de sondagem de 0,21mm e ganhos de inserção clínica de 0,23mm. Aos 6 meses não houve diferença significativa, mostrando que a terapia pode ter algum benefício a curto prazo. Não houve recomendação da terapia devido aos números modestos obtidos que possuem baixa relevância clínica.

No mesmo ano, Sgolastra et al. (2013b), publicaram uma revisão mais criteriosa e robusta incluindo 14 artigos, entre eles, 7 utilizados em revisões anteriores. Foi considerado um tempo de acompanhamento de 3 e 6 meses. Até 3 meses os resultados obtidos foram 0,19mm de redução na profundidade de sondagem e 0,37mm de ganho de inserção clínica. Novamente, os autores não encontraram diferenças após 6 meses, recomendando a terapia para quando se deseja um resultado a curto prazo.

O fato de alguns autores não terem encontrado diferenças nas terapias após 6 meses pode ser pelo reduzido número de trabalhos com acompanhamento a longo prazo. Algumas informações da revisão de Sgolastra et al. (2013b) são interessantes, como o fato de estudos paralelos e boca dividida não mostrarem diferenças nas análises. Os autores mostraram também que, um tempo de aplicação de 60s mostra maior redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica. O tipo de corante e parâmetros do laser não puderam ser analisados devido à grande variedade nos estudos. Mas, nota-se que todos utilizaram comprimentos de onda entre 660 e 680nm que possuem picos de absorção nos corantes utilizados: cloreto de fenotiazina (HELBO®) e azul de metileno (Periowave® e preparados). Nenhum trabalho clínico dessa revisão utilizou azul de toluidina (SGOLASTRA et al., 2013b).

Apesar de as revisões mostrarem mais resultados positivos que negativos, ganhos menores que 0,5mm são irrelevantes clinicamente, portanto deve-se analisar com cautela os resultados de revisões sistemáticas. Elas utilizam critérios de inclusão e exclusão, bem como de categorização dos artigos, extremamente rígidos, excluindo-se muitas vezes boas pesquisas.

2.5 A IDEIA DO PRESENTE ESTUDO

O grupo de pesquisa da Periodontia FOB-USP teve sua primeira experiência com terapia fotodinâmica com o trabalho de Salmeron et al. (2013), iniciado por volta de 2009. Discos de titânio contaminados por biofilme bucal *in situ* foram descontaminados por terapia fotodinâmica com azul de toluidina O e laser vermelho de 660nm, laser somente e corante somente, e implantados em dorso de ratos. Cortes histológicos foram avaliados nos períodos de 7, 28 e 84 dias com relação à reação inflamatória e formação de cápsula fibrosa. O grupo tratado por aPDT mostrou a menor área de tecido reativo ao redor do disco, no período de 7 dias, mostrando bom resultado a curto prazo da terapia fotodinâmica.

Outra experiência do grupo foi clínica, com o tratamento de um paciente que possuía pigmentação negra recorrente na coroa dentária (PESSOA, 2011). O paciente sofria *bullying* na escola devido aos “dentes pretos” e, mesmo com profilaxia profissional constante, havia recorrência das manchas em 15 a 30 dias. Amostras do biofilme foram coletadas para identificação dos patógenos e foram encontradas 5 bactérias periodontopatogênicas *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens*. O tratamento proposto foi a terapia fotodinâmica com azul de Toluidina O (100µg/ml – produzido em farmácia de manipulação) associado ao laser vermelho 660nm (FlashlaseIII - DMC São Carlos, SP, Brazil) - 100 mW, 70 J/cm², 23 s/superfície dentária, spot 600µm. A aplicação foi feita em 5 sessões para completar boca toda. Imediatamente após a aPDT, as manchas foram removidas por raspagem e alisamento radicular seguido de polimento com taças de borracha. Houve uma redução em todas as bactérias analisadas sendo a *P. intermedia*, totalmente eliminada. Houve redução do índice de sangramento à sondagem de 46,52% para 13,58%. Não houve repigmentação após 7 meses da terapia. O único efeito colateral relatado pelo paciente foi hiperestesia dentinária após a aplicação da aPDT com a necessidade de aplicação de flúor tópico após o polimento das coroas.

Com a ocorrência de hiperestesia dentinária no caso anterior, supomos que pudesse ter ocorrido desmineralização dentária. Foi quando procuramos medir o pH do corante azul de Toluidina O. Para nossa surpresa, o pH encontrado estava entre 4 e 5. Daí surgiu a ideia de um primeiro trabalho nessa linha, para verificar se a terapia fotodinâmica com azul de toluidina seria capaz de causar desmineralização.

Portanto, o objetivo da pesquisa foi avaliar a desmineralização, em dentes bovinos, causada pelo corante com dois pHs diferentes (4 e 5) por meio de microdureza e perfilometria

(DUCATI et al., 2013). Esses corantes foram preparados na concentração de 100µg/ml de azul de toluidina O em água destilada e seu pH não foi corrigido. Os resultados mostraram que os dois corantes provocaram uma perda de dureza superficial tanto no esmalte quanto em dentina e também uma perda de estrutura da ordem de 9 a 12µm. Isso nos levou a um alerta sobre a possibilidade de o corante, quando com pH mais ácido, alterar a estrutura mineral de esmalte e dentina. Em esmalte esse efeito não é desejado, mas na dentina de raízes expostas, previamente ao recobrimento radicular, essa desmineralização seria interessante, pois mimetizaria o efeito do ácido cítrico comumente utilizado em cirurgias periodontais.

Outro trabalho realizado nessa linha de pesquisa foi a tese de mestrado de Karam (2013) na qual fragmentos de raízes humanas foram tratadas com lasers de alta intensidade, ácido cítrico + tetraciclina (pH1) e aPDT com azul de toluidina O em pH4. Os fragmentos radiculares foram utilizados para condicionar o meio de cultura de fibroblastos gengivais humanos que foram cultivados por 24, 48, 72 e 96h. Houve maior viabilidade celular após 48 e 72h no grupo tratado com aPDT. Após 96h o grupo tratado com ácido cítrico apresentou maior viabilidade celular. Os resultados mostraram que o corante, mesmo em pH mais ácido é biocompatível (DAMANTE et al., 2013; KARAM, 2013).

O trabalho mais recente feito com os corantes em pH 4 e 5 foi o de Ferreira et al. (2014). Fragmentos de raízes humanas perdidas por doença periodontal foram tratados por químicos convencionais como ácido cítrico + tetraciclina, EDTA, ácido fosfórico, e também por aPDT com azul de toluidina O em pH 4 e 5. Sobre essas raízes foram cultivados fibroblastos gengivais humanos por 24, 48 e 72h. As células foram contadas em fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Os resultados mostraram maior crescimento no grupo tratado com ácido cítrico + tetraciclina ($p < 0,05$). Os corantes em pH 4 e 5 foram semelhantes ao grupo controle que recebeu apenas raspagem ($p > 0,05$). O crescimento celular no grupo tratado por EDTA e ácido fosfórico foi prejudicado. Esses resultados mostraram mais uma vez que os corantes são biocompatíveis.

Vale a pena ressaltar que temos medido o pH dos corantes sempre que são preparados em água deionizada ou destilada e, na maioria das vezes, o azul de toluidina O (100µg/ml) e o azul de metileno (50µg/ml) possuem pH entre 5 e 6. Procuramos armazená-los em frasco âmbar em geladeira. Ainda não encontramos uma explicação absoluta para algumas preparações de azul de toluidina O terem apresentado pH mais ácido, mas supomos que o contato repetido com a luz, mesmo que breve, pode gerar queda no pH do corante, havendo talvez a necessidade de adição de uma solução tampão. Também observamos que soluções de

estoque de azul de toluidina preparadas na concentração de 1000µg/ml apresentam pH médio de 4,3. O trabalho de Núñez (2007) explica em parte essas dúvidas, mostrando que após a adição do FS ao solvente há uma queda de pH. Corantes fenotiazínicos mostraram queda de pH de 6,3 para 5,8 em água deionizada, 6,1 para 5,7 em água destilada, 6 para 5,3 em água estéril e 6 para 5,5 em solução salina. A autora também sugeriu que altas concentrações do corante podem reduzir o seu pH e alterar a banda de absorção.

Com base em todos os trabalhos acima citados, surgiu-se a ideia de criar um corante para terapia fotodinâmica com pH1, semelhante ao ácido cítrico utilizado para biomodificação radicular em Periodontia. Dessa forma o efeito bactericida seria aliado ao de desmineralização superficial da dentina durante cirurgias periodontais.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi criar um novo corante para terapia fotodinâmica em Periodontia e avaliar sua biocompatibilidade e poder bactericida e/ou bacteriostático.

Os objetivos específicos foram responder as seguintes perguntas:

- a) O novo corante tem capacidade de desmineralização da estrutura dentária?
- b) O tempo de aplicação do novo corante influencia a desmineralização da estrutura dentária?
- c) O novo corante à base de metileno ou toluidina tem as mesmas propriedades ópticas que os corantes convencionais?
- d) A superfície de dentina tratada pelo novo corante é biocompatível?
- e) O novo corante à base de azul de toluidina tem poder bactericida/bacteriostático semelhante ao corante convencional?
- f) O novo corante à base de azul de metileno tem poder bactericida/bacteriostático semelhante ao corante convencional?

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A descrição detalhada do novo corante não será realizada, pois há um pedido de patente em análise na agência USP de inovação - processo RUSP: 13.1.1139.25.2 (Anexo A) – a qual autorizou a defesa dessa tese. Uma informação relevante é que ele tem pH ácido e é à base de corantes azuis. Inicialmente foi utilizado um corante à base de azul de toluidina, porém após os resultados dos experimentos de propriedades ópticas, o azul de metileno também foi testado.

4.1 EXPERIMENTO 1 – O NOVO CORANTE TEM CAPACIDADE DE DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?

Esse experimento foi realizado no laboratório de bioquímica da FOB-USP com fragmentos de dente bovino e novo corante à base de azul de toluidina.

Blocos de esmalte (n=15) e dentina (n=15) radicular foram divididos nos seguintes grupos:

C - controle - corante convencional azul de toluidina, pH5;

NC - novo corante - Azul de toluidina, pH1;

AC - ácido cítrico+tetraciclina, pH1.

4.1.1 Preparo dos grupos experimentais

Foram utilizados dentes bovinos submetidos à análise visual, para a averiguação de possíveis manchas e trincas, situação na qual foram excluídos da amostra. Primeiramente foram separadas as raízes, com o auxílio de um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni/ Série 16223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes.

Na sequência, as coroas foram fixadas com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40x40x5mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e com dois discos diamantados de dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7mm³ (Extex Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7cm de diâmetro, 4mm de espessura e orifício central de 1,3cm) entre os discos, com 300rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos os blocos de esmalte de 4 x 4mm da porção mais plana da coroa, através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal. Após o corte de todos os blocos de esmalte, foi dado prosseguimento ao preparo dos blocos de dentina. Primeiramente, foram obtidas fatias da porção cervical da raiz através de um corte na direção mésio-distal, com a utilização dos dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 4mm. Após a obtenção das fatias radiculares, dois espécimes 4 x 4mm foram obtidos através de uma secção no sentido vestibulo-lingual, utilizando dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 4mm.

Após a obtenção de todos os espécimes de esmalte e dentina radicular, iniciou-se a correção de forma (melhora da planeza) e acabamento superficial (polimento). Os blocos 4x4 mm foram fixados com cera pegajosa Kota com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco de acrílico (30mm de diâmetro por 8mm de espessura), com a face de esmalte ou cemento externa voltada para o disco, com o intuito de realizar primeiramente a diminuição do desvio de planeza da dentina interna. O conjunto (disco de fixação/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica para realizar a diminuição do desvio de planeza por meio do processo de lixamento da dentina, garantindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico no qual são fixados os espécimes. Para tal, foi utilizada uma lixa de carbetto de silício de granulação 320, sob refrigeração com água deionizada, até que os blocos ficassem com espessura de aproximadamente 3mm. Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, entre 30 s e 3 min, até se alcançar a espessura desejada.

Em seguida, os blocos foram removidos do disco de acrílico, sendo aqueles limpos com xilol (MERCK, Darmstadt-Germany), para que se retirasse todo o resíduo de cera aderido a eles. Posteriormente, foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico com a face de esmalte ou dentina externa/cimento exposta, para que se realizasse a correção de forma e o polimento, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base, indispensável para a realização dos testes. Novamente o conjunto foi

levado a politriz adaptada e o esmalte ou dentina externa foi desgastado com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada (2-3 minutos para o esmalte e 30s a 1 minuto para a dentina), com 2 pesos, em velocidade baixa. Em seguida, foi feito o lixamento do esmalte ou dentina externa com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp.), sob refrigeração (2-3 minutos para o esmalte e 1-2 minutos para a dentina), com 2 pesos, em velocidade alta. Para finalizar, o polimento, foi realizado com um feltro (Extec Corp.) umedecido com uma suspensão de diamante de 1µm de diâmetro médio equivalente (Buehler), com 2 pesos, em velocidade alta (2-3 minutos para o esmalte e 1-2 minutos para a dentina). Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do lixamento das seguintes, entre cada etapa, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultrassom T7 Thornton, com frequência de 40KHz, durante 2 minutos, com água deionizada. Ao final do polimento dos blocos, este procedimento foi repetido.

Nos grupos C e NC os fragmentos foram banhados pelos corantes através de uma bolinha de algodão. Em seguida foi aplicado o laser (TheraLase - DMC – São Carlos) com as seguintes especificações, baseadas no trabalho de Salmeron et al. (2013): vermelho, 660nm, 30mW, 45J/cm², modo contínuo, aplicação por varredura por 30s. Imediatamente após a aplicação do laser os fragmentos foram irrigados com água deionizada.

No grupo AC, o gel de ácido cítrico (50% mais tetraciclina 10%) foi colocado sobre o fragmento com auxílio de um pincel e após 3 minutos foi lavado com água deionizada.

4.1.2 Teste de microdureza

A microdureza Knoop foi avaliada em todos os blocos por meio do Microdurômetro Shimadzu (HMV 2000) com 5 endentações a distância de 100µm cada, 25g e 10s para o esmalte e 10g e 10s para a dentina), no início (SH) e ao final do experimento (SH final). Dessa forma, calculou-se a porcentagem de perda de microdureza de superfície [%SHC = (SMH final – SMH inicial)/ SMH inicial) x100] (ATTIN, 2006).

4.1.3 Perfil de superfície

Perfis das superfícies de esmalte/dentina foram obtidos com um perfilômetro de contato (MarSurf GD 25 - Alemanha). Antes do tratamento químico as bordas dos fragmentos foram protegidas com esmalte de unha deixando somente uma faixa no centro a sofrer ação dos químicos. Para a determinação da alteração do perfil da superfície após o experimento, o esmalte cosmético de unha foi removido com auxílio de espátula e de uma solução de acetona (1:1 – acetona: água) para limpeza da superfície, e as leituras foram realizadas. Em cada leitura, cinco varreduras (2x2mm²) foram realizadas no centro da superfície do esmalte/dentina a uma distância de 250 µm cada. A média de desgaste (µm) foi calculada usando o software MarSurf XT 20 - v.3.01-03.4 - Alemanha.

A Figura 1 mostra um esquema com a sequência dos experimentos dessa etapa.

Figura adaptada de Honório, H.M.

Figura 1 - Sequência do experimento. Após corte e polimento na politriz, os fragmentos de esmalte e dentina bovina foram protegidos nas bordas por esmalte de unha vermelho. Foi medida a microdureza inicial e depois foram realizados os tratamentos: C (terapia fotodinâmica com azul de toluidina O, pH5), NC (terapia fotodinâmica com novo corante, pH1), AC – ácido cítrico com tetraciclina (pH1). Foi feita a microdureza final e a perfilometria

4.1.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Após os testes de normalidade, foi utilizado o teste ANOVA complementado por Tukey para múltiplas variáveis e teste t de Student para dados pareados.

4.2 EXPERIMENTO 2 – O TEMPO DE APLICAÇÃO DO NOVO CORANTE INFLUENCIA A DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?

Esse experimento foi realizado no laboratório de bioquímica da FOB-USP com fragmentos de dente bovino e novo corante à base de azul de toluidina.

Apenas blocos de dentina radicular foram utilizados, uma vez que no experimento 1 comprovamos a perda mineral provocada pelo novo corante. Essa perda não é desejada em esmalte, apenas em dentina durante procedimentos de condicionamento químico radicular. Os blocos de dentina foram divididos nos seguintes grupos, segundo o tempo de aplicação do corante:

NC30 - Novo corante – 30s;

NC60 - Novo corante – 60s;

NC90 - Novo corante – 90s;

NC180 - Novo corante 180s;

AC - ácido cítrico 50% com tetraciclina 10% (pH1), por 180s.

Nos grupos NC os fragmentos foram banhados pelo novo corante através de uma bolinha de algodão pelo tempo determinado. Em seguida foi aplicado o laser (TheraLase - DMC – São Carlos) com as seguintes especificações, baseadas no trabalho de Salmeron et al. (2013): vermelho, 660nm, 30mW, 45J/cm², modo contínuo, aplicação por varredura por 30s. Imediatamente após a aplicação do laser os fragmentos foram lavados com água deionizada.

No grupo AC, o gel de ácido cítrico foi colocado sobre o fragmento com auxílio de um pincel e após 180s foi lavado com água deionizada.

A metodologia foi exatamente a mesma descrita nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3 do experimento 1.

4.2.1 Análise estatística

A análise estatística foi feita a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Após os testes de normalidade, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis complementado por Dunn para as comparações múltiplas e teste paramétrico t de Student para os dados pareados.

4.3 EXPERIMENTO 3 – O NOVO CORANTE À BASE DE METILENO OU TOLUIDINA TEM AS MESMAS PROPRIEDADES ÓPTICAS QUE O CONVENCIONAL?

Esse experimento foi realizado por Clóvis Grecco no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, Instituto de Física de São Carlos – USP. Foram testados os novos corantes à base de azul de toluidina e azul de metileno.

4.3.1 Medidas de absorbância do azul de toluidina e do novo corante

A primeira parte do experimento foi realizada com o novo corante à base de azul de toluidina em comparação ao convencional na concentração de 100µg/ml.

Foram realizadas medidas de absorbância do azul de toluidina para o pH7,17 e pH1,0. Foi utilizado um espectrofotômetro Variant Cary 50 Bio UV- VIS (USA). Devido à coloração da amostra, ela foi posicionada em uma cubeta com caminho óptico de 2mm. Para a correção do espectro com relação ao solvente, foi realizada uma linha de base utilizando água deionizada milli-Q. A temperatura da sala foi mantida em torno de 20°C.

4.3.2 Medidas de fotodegradação do azul de toluidina e do novo corante

O estudo da fotodegradação de um composto fotossensível é uma medida importante da eficiência deste com relação a sua aplicação em terapia fotodinâmica. A taxa de fotodegradação é uma medida importante que está relacionada com a eficiência quântica de formação de espécies reativas.

Neste estudo foi realizada a degradação do composto de azul de toluidina no pH7, 17 com fontes de luz com emissão em 635nm e 660nm a fim de comparar a interação da luz com

as moléculas do azul de toluidina nestes comprimentos de onda específicos que estão fora do máximo de absorbância do composto que está centrado em 585,9nm.

O máximo de absorbância em 585,9 foi o comprimento de onda escolhido o estudo da fotodegradação. Foi colocado 400µL de volume da solução em uma cubeta de caminho óptico de 2mm. Para a entrega da luz, foi utilizando uma fibra óptica posicionada a 45mm da amostra. Desta maneira o diâmetro da luz foi suficiente para iluminar toda amostra. A irradiância calculada para esta distância foi de 60mW/cm². Os tempos de iluminação investigados foram de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos. Em cada tempo, a fonte de luz era desligada, a cubeta colocada em um espectrofotômetro Agilent Cary BIOS – UV VIS (EUA) e os espectros de absorbâncias coletados.

Como fonte de luz emitindo em 635nm foi utilizado um laser de diodo (Quantum Tech – São Carlos, Brasil) e como fonte de luz que emitindo em 660nm, um laser de diodo Eagle Heron 2W (Quantum Tech – São Carlos, Brasil). Os espectros coletados para os diferentes tempos de iluminação foram processados via software matemático Origin Lab.

4.3.3 Medidas de absorbância do azul de metileno e do novo corante

Como os lasers mais comuns no mercado brasileiro e acessíveis aos dentistas em geral emitem luz vermelha no comprimento de 660nm, optamos por realizar os mesmos experimentos com corantes à base de azul de metileno, que possui absorbância mais próxima desses lasers.

A amostra de azul de metileno avaliada tinha o peso molecular de 373,9g/mol e concentração de 100µg/mL. Nesta concentração foi detectado um problema para a leitura das amostras, pois os espectros de absorção estavam saturando o detector do espectrofotômetro. Por este motivo foi feita a diluição da amostra para 50µg/mL.

4.3.4 Medidas de fotodegradação do azul de metileno e do novo corante

Neste estudo foi realizado a fotodegradação do composto azul de metileno em pH1 e pH5,5 com fontes de luz que emitem em 635nm e em 660nm. A metodologia utilizada foi a mesma citada nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

4.4 EXPERIMENTO 4 – A SUPERFÍCIE DE DENTINA TRATADA PELO NOVO CORANTE É BIOCOMPATÍVEL?

Este experimento foi realizado no laboratório de Cultivo Celular da disciplina de bioquímica da FOB-USP com o novo corante à base de azul de toluidina. No momento da realização desse experimento, ainda não estávamos com os resultados dos experimentos de óptica em mãos, portanto o corante à base de metileno não foi testado.

Nessa etapa foram utilizados dentes humanos extraídos por motivo de doença periodontal. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP (Parecer 721.759 / CAAE 09481614.0.0000.5417) (Anexo B).

Blocos raiz humanos (triplicata) foram divididos nos seguintes grupos:

C - controle (sem tratamento químico, apenas raspagem e alisamento radicular);

CC - terapia fotodinâmica (corante convencional pH5);

NC - terapia fotodinâmica (novo corante pH1).

Foram coletados 14 dentes extraídos por motivo periodontal na clínica de Periodontia e Cirurgia da FOB-USP. Os pacientes assinaram um termo de doação de dentes aprovado pelo comitê de ética com pesquisa em seres humanos da FOB-USP.

Os dentes foram preparados para obtenção de fragmentos com dimensões padronizadas de aproximadamente 4mm de comprimento, 2mm de largura e 2mm de espessura e foram derivados de áreas contaminadas, com superfície plana, sem a presença de sulcos ou depressões anatômicas. Após a confecção dos fragmentos, estes ficaram armazenados em frascos contendo soro fisiológico estéril e mantidos em geladeira. Antes da utilização em cultura, os fragmentos foram esterilizados em autoclave. No total foram utilizados 27 fragmentos. Todos os fragmentos foram submetidos a raspagem e alisamento radicular com 20 golpes de cureta antes de cada tratamento nos grupos experimentais.

Para os grupos de terapia fotodinâmica, os fragmentos foram banhados pelos corantes através de uma bolinha de algodão por 60s. Em seguida foi aplicado o laser (TheraLase - DMC – São Carlos) com as seguintes especificações, baseadas no trabalho de Salmeron et al. (2013): vermelho, 660nm, 30mW, 45J/cm², modo contínuo, aplicação por varredura por 30s. Imediatamente após a aplicação do laser os fragmentos foram irrigados

com água deionizada. O grupo controle recebeu apenas os 20 golpes de cureta e irrigação com água deionizada.

4.4.1 Cultivo celular

As células utilizadas foram fibroblastos gengivais humanos (FGH) obtidos anteriormente por cultura primária a partir de um fragmento de gengiva humana e armazenados em nitrogênio líquido no laboratório de cultivo celular da disciplina de Bioquímica (DAMANTE et al., 2013). As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono.

Para o experimento de proliferação, os fragmentos foram colocados em placas de 24 poços. Foram plaqueadas 10^4 células por poço (em triplicata), na 5ª passagem, pelos períodos experimentais de 24, 48, 72h. Os espécimes foram posteriormente fixados em solução de Karnovsky, tetróxido de ósmio e concentrações crescentes de acetona para a realização de microscopia eletrônica de varredura.

Os fragmentos contendo as células foram fotografados no microscópio eletrônico de varredura com distância focal de 20mm e aumento de 500X (Personal SEM[®] eXpress - Delmont, Pennsylvania, USA - adquirido por processo FAPESP # 12/06738-9 para a FOB-USP). Foram obtidas eletromicrografias de cinco áreas de cada fragmento localizadas no centro, campo superior direito, campo inferior direito, campo inferior esquerdo e campo superior esquerdo com o objetivo de abranger as mesmas áreas de todos eles. A contagem de células foi realizada de acordo com Feist et al. (2003).

Um examinador cego ao estudo e calibrado realizou as contagens das células nas fotografias obtidas no microscópio de varredura. A calibração consistiu de duas medidas feitas com 15 dias de distância e a consistência das medidas foi avaliada por testes estatísticos: Erro casual de Dahlberg, Erro sistemático pelo teste t pareado e correlação.

4.4.2 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de medidas repetidas complementado por Tukey ($p < 0,05$).

4.5 EXPERIMENTO 5 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE TOULUIDINA TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?

Esse experimento foi realizado no Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP com o corante à base de azul de toluidina.

Para esse ensaio foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 1 (Cocos Gram positivos) e *Escherichia coli* 0:124 1 (Gram negativa anaeróbica facultativa). Foram realizados experimentos de efeito bactericida e bacteriostático da terapia.

Após cultivo inicial em BHI (Brain Heart Infusion) a turvação das suspensões bacterianas foi padronizada em espectrofotômetro a 540nm em comparação com o padrão 0,5 da escala de MacFarland. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10 o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Os grupos experimentais foram divididos em:

SaC - *S. aureus* Controle;

EcC - *E. coli* Controle;

SaC0 - *S. aureus* corante normal;

SaC1 - *S. aureus* novo corante;

EcC0 - *E. coli* corante normal;

EcC1 - *E. coli* novo corante;

SaC0laser - *S. aureus* corante normal + laser;

SaC1laser - *S. aureus* novo corante + laser;

EcC0laser - *E. coli* corante normal + laser;

EcC1laser - *E. coli* novo corante + laser.

Foram adicionados 100µl de suspensão bacteriana com meio em cada poço nas placas de 96 poços. Os corantes na concentração de 200µg/ml foram adicionados com a mesma medida da suspensão bacteriana a fim de ficarem com concentração final de 100 µg/ml. Nos grupos de laser, os poços foram irradiados com laser vermelho – 660nm (Thera Lase, São Carlos, Brasil), 100mW, 45 J/cm², 12s.

A turvação dos poços foi medida em espectrofotômetro a 540nm e os dados de densidade óptica foram obtidos para o experimento de efeito bacteriostático após 24h da semeadura.

Para o experimento de efeito bactericida, placas de petri foram divididas em 4 partes e cada parte recebeu 25µl da suspensão bacteriana com PBS. No caso do grupo controle, foram colocadas as 4 diluições menos concentradas. Com o auxílio da alça de Drigalsky essa quantidade foi espalhada dentro de cada quadrante. O quadrante de número 4 foi o quadrante com a amostra mais diluída. Após esta etapa, as placas ficaram em estufa e após 24 horas foi feita a contagem das colônias de bactérias. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram transformadas em número de bactérias para os resultados.

4.5.1 Análise estatística

No teste bactericida não foi possível realizar análise estatística pela presença de colônias incontáveis. Para o teste bacteriostático após o teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrar distribuição normal foi feito o teste ANOVA complementado por Holm-Sidak a um nível de significância de 5%. Para comparação dos dois tipos bacterianos os dados foram transformados em porcentagem de morte bacteriana e foram aplicados os mesmos testes citados acima.

4.6 EXPERIMENTO 6 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE METILENO TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?

Esse experimento foi conduzido conforme descrito no item anterior, utilizando-se o novo corante à base de azul de metileno. Foi realizado apenas o experimento do efeito

bacteriostático da terapia após 24h da semeadura e foi acrescentado um grupo controle negativo com antibiótico, além dos controles positivos.

4.6.1 Análise estatística

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição não-normal, portanto a comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis complementado por Tukey ($p < 0,05$). Após transformação em porcentagem para comparação das duas bactérias, os dados não passaram no teste de normalidade e foram aplicados os mesmos testes acima citados.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 – O NOVO CORANTE TEM CAPACIDADE DE DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?

Em relação ao experimento de microdureza, é possível observar perda significativa da dureza após todos os tratamentos como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dureza inicial e final da dentina e esmalte para os grupos NC=novo corante, C=azul de toluidina O convencional, AC=ácido cítrico mais tetraciclina

	Dureza superficial dentina			Dureza superficial esmalte		
	NC	C	AC	NC	C	AC
Inicial	26,87 ±12,23	26,64±10,49	29,13±11,48	371,55 ± 31,20	371,55 ± 27,71	371,20 ± 33,74
Final	8,74±3,94	17,62 ±3,79	6,35±2,25	165,99 ± 37,44	219,93 ± 39,82	118,87,22 ± 49,41
	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01

Na Tabela 2, observa-se que a porcentagem de perda de dureza superficial no esmalte teve diferenças significantes ($p<0,01$) entre todos os grupos sendo que a maior perda de dureza ocorreu com o ácido cítrico (AC), seguido do novo corante (NC) e seguido do corante convencional azul de toluidina (C). Já para dentina, não houve diferenças significantes entre os grupos novo corante e ácido cítrico, os quais geraram maior perda de dureza que o corante convencional.

Tabela 2 - Porcentagem de perda de dureza superficial do esmalte e dentina

% Perda de dureza superficial esmalte			% Perda de dureza superficial dentina		
NC	C	AC	NC	C	AC
55,514 ± 9,03 ^a	40,85 ± 11,01 ^b	68,01 ± 12,40 ^c	63,92 ± 16,19 ^a	32,4 ± 19,97 ^b	75,82 ± 11,97 ^a

Letras diferentes= $p<0,01$.

NC= novo corante; TBO= azul de toluidina O convencional; AC= ácido cítrico.

Em relação à perfilometria, os perfis de superfície não foram diferentes entre os grupos nem para os grupos do esmalte nem para os da dentina como pode ser visto na Tabela

3. Nos gráficos de perfilometria da Figura 2 a diferença parece evidente, porém são apenas exemplos de um bloco de cada grupo.

Tabela 3 - Desgaste em µm na dentina e esmalte nos diferentes grupos

	Esmalte			Dentina		
	NC	C	AC	NC	C	AC
Média	10,33	10,72	9,54	8,37	6,44	7,06
DP	4,32	4,39	3,73	1,05	4,33	2,07

p>0,05
NC= novo corante; C= azul de toluidina O convencional; AC= ácido cítrico.

C= corante convencional azul de toluidina, pH5; AC= ácido cítrico+tetraciclina, pH1; NC= novo corante - Azul de toluidina, pH1.

Figura 2 - Gráficos de perfilometria. Desgaste provocado pelos corantes e ácido cítrico em blocos de esmalte e dentina bovinos

5.2 EXPERIMENTO 2 – O TEMPO DE APLICAÇÃO DO NOVO CORANTE INFLUENCIA A DESMINERALIZAÇÃO DA ESTRUTURA DENTÁRIA?

Em relação à porcentagem de perda de dureza superficial, os grupos NC60 (93,7%), NC180 (89,7%) e AC (90,3%) foram estatisticamente semelhantes ($p>0,05$) conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de perda de dureza superficial obtida por teste de microdureza

	NC30	NC60	NC90	NC180	AC
Média	87,672 ^{ab}	93,721 ^d	86,385 ^{ac}	89,713 ^{ad}	90,359 ^{ad}
DP	6,933	2,335	8,648	2,789	4,138

Letras diferentes= $p<0,05$.

DP= desvio padrão.

Em relação à perfilometria, o novo corante aplicado por 180s causou um desgaste de 2,271 μm , que foi estatisticamente semelhante ao ácido cítrico ($p>0,05$) - também aplicado por 180s e com pH1 - cujo desgaste foi 7,335 μm (Tabela 5). Essa semelhança do novo corante ao ácido cítrico (Figura 3) era desejada na presente pesquisa.

Tabela 5 - Desgaste em μm obtido por perfilometria

	NC30	NC60	NC90	NC180	AC
Média	1,604 ^{ac}	1,579 ^{ac}	1,365 ^{ab}	2,271 ^{cd}	7,335 ^d
DP	0,609	0,542	0,417	0,426	1,653

Letras diferentes= $p<0,05$.

DP= desvio padrão.

Figura 3 - Perfilometria do grupo tratado pelo novo corante por 180s (NC180) e o ácido cítrico mais tetraciclina (AC) por 180s. O desgaste foi semelhante em ambos os grupos

5.3 EXPERIMENTO 3 – O NOVO CORANTE À BASE DE TOLUIDINA E METILENO TEM AS MESMAS PROPRIEDADES ÓPTICAS QUE O CONVENCIONAL?

5.3.1 Experimentos com o azul de toluidina

A Figura 4 mostra os espectros de absorbância para as amostras avaliadas de azul de toluidina para o pH7,17 (linha preta) e pH1 (linha vermelha), sendo que o primeiro tem uma grande banda de absorção centrada em 585nm. Este seria o comprimento de onda adequado para se obter o máximo de absorção de energia por essa molécula.

Figura 4 - Picos de absorbância para o corante convencional (linha preta) e para o novo corante (linha vermelha). Nota-se que não há picos de absorbância no espectro de 660nm

Visando alcançar uma profundidade maior de penetração no tratamento, o comprimento de onda indicado para a excitação da molécula deve ser em 630nm, mesmo não sendo o máximo de absorção, ainda apresenta uma grande intensidade de absorção e é coincidente com a janela biológica (620-850nm, aproximadamente).

O espectro do composto em pH1 não mostrou grandes diferenças com relação à medida inicial. Houve uma pequena diminuição na intensidade de absorção com relação amostra em pH7,17 e um deslocamento do máximo da banda de absorção de 585nm para 575nm.

A taxa de fotodegradação das amostras estudadas está ilustrada na Figura 5.

Figura 5 - Gráfico da Intensidade de Absorbância normalizada no comprimento de onda de 585,9nm em função do tempo de iluminação

A partir deste gráfico de decaimento da absorbância ao longo do período de iluminação, vê-se que o laser de 635nm promove uma taxa de degradação maior do que o laser de 660nm. Esta menor taxa está relacionada com menor eficiência na geração de espécies reativas para a terapia fotodinâmica. As curvas de degradação para as fontes de luz empregadas foram ajustadas por um modelo de decaimento exponencial:

$$[S_0](x) = [S_0]_0 \exp\left(-\frac{x}{\tau}\right)$$

Onde, $[S_0]_0$ é a concentração inicial do fotossensibilizador, x é o tempo de iluminação (min.), $[S_0](x)$ é a concentração de moléculas que podem absorver fótons depois um tempo de iluminação e τ é a constante de decaimento.

A função exponencial pode ser escrita como uma série infinita. Quando a constante de decaimento for muito grande, o argumento da função exponencial é muito pequeno, portanto elementos de ordens mais elevadas na expansão podem ser desprezados e a aproximação é uma função linear;

$$e^x = \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{x^n}{n!} \right) = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots$$

Os dados experimentais foram ajustados por esta aproximação através de uma curva linear:

$$[S_0](x) = [S_0]_0 - kx$$

E a taxa de fotodegradação pode ser calculada pela expressão:

$$-\frac{d[S_0]}{dx} = k$$

Onde k é a taxa de fotodegradação. Os valores obtidos por este ajuste estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Taxas de fotodegradação promovida pelas fontes de luz de 635nm e 660nm

	k	Desvio Padrão	R^2
635nm	$3,29 \times 10^{-3}$	$0,09 \times 10^{-3}$	0,99996
660nm	$1,35 \times 10^{-3}$	$0,06 \times 10^{-3}$	0,99999

5.3.2 Experimentos com o azul de metileno

Conforme escrito no capítulo de Materiais e Métodos, o azul de metileno na concentração de $100 \mu\text{g/ml}$ saturaram o leitor do espectrofotômetro. Desta forma foi realizada apenas 1 diluição o que não alterou o pH consideravelmente uma vez que para realizar a mudança de 1 log, ou seja, mudar o pH de 1 para 2, é necessário realizar uma diluição de 10x. Assim, a Figura 6 mostra que ambos os corantes possuem um pico de absorção no espectro de 660nm, sendo mais compatíveis com os lasers que são utilizados comumente e estão no mercado para cirurgias dentistas.

Figura 6 - Espectro de absorvância em função do comprimento de onda para a amostra com pH1 e pH5,5 na concentração de 50 μ g/mL

Em relação ao experimento de fotodegradação dos corantes, os espectros de absorvância para os diferentes tempos de iluminação não mostraram grandes variações com a fonte de luz em 660nm para amostra em pH1. Para pH5,5 pode-se perceber uma leve taxa de degradação (Figura 7). Foi usado como referência o máximo de emissão em 663nm. Os valores para cada um dos espectros foram reescritos em termos de concentração molar. Foi construído um gráfico da concentração molar em função do tempo de iluminação (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Gráfico da concentração molar em função do tempo de iluminação para uma fonte de luz de 660nm

Figura 8 - Gráfico da concentração molar em função do tempo de iluminação para uma fonte de luz de 635nm

As amostras de azul de metileno com pH1, não apresentam diferença com relação aos tempos iniciais de iluminação para os comprimentos de onda de iluminação utilizados. As amostras de azul de metileno com pH5,5 apresentaram baixa taxa de fotodegradação com relação aos tempos iniciais de iluminação para os dois comprimentos de onda utilizados. Olhando para a Figura 7, percebe-se que com o laser de 660nm, há uma taxa de fotodegradação, porém é tão lenta que para realizar os cálculos de taxa, teria que se ajustar o decaimento para um ajuste linear. Foi realizado apenas o ajuste na curva com iluminação em 660nm e o valor da taxa encontrada foi de $(0,0059 \pm 0,0001)$ pico-molar/segundo).

5.4 EXPERIMENTO 4 – A SUPERFÍCIE DE DENTINA TRATADA PELO NOVO CORANTE É BIOCOMPATÍVEL?

Os resultados mostraram que o examinador cego estava bem calibrado (Erro casual de Dahlberg = 0,21, Erro sistemático pelo teste t pareado $p=0,741$ e correlação das duas medidas altíssima = 0,96). O resultado da contagem de células nas fotos do MEV pode ser visto na Figura 9. Não houve diferenças entre os grupos ($p>0,05$), mas houve diferença entre os períodos de 24 e 48h para o de 72h ($p<0,01$). O novo corante teve número de células semelhantes ao controle e ao corante convencional, mostrando ser seguro e biocompatível, inclusive com crescimento celular ao longo do tempo (Figura 10).

Barras= desvio padrão; C= controle; NC= terapia fotodinâmica com novo corante; CC= terapia fotodinâmica com corante convencional.

Figura 9 - Número de células por grupo e período. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$) em cada período. Entre os períodos houve diferença significativa (asterisco = $p<0,01$), mostrando um crescimento celular ao longo do tempo

C= grupo controle, NC= terapia fotodinâmica com novo corante, CC= terapia fotodinâmica com corante convencional.

Figura 10 - Fibroblastos gengivais humanos (setas) presentes em cada grupo e período analisados

5.5 EXPERIMENTO 5 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE TOLUIDINA TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?

A Tabela 7 mostra os resultados do experimento que testou o efeito bactericida dos corantes. Observa-se que o corante ácido reduziu o número de *S. aureus* quando usado sozinho e teve efeito bactericida quando associado ao laser. Em relação a *E.coli*, houve redução do número de bactérias com o corante ácido, porém não houve morte e sim proliferação bacteriana quando associado ao laser sendo que o corante convencional mais o laser teve efeito bactericida. Em resumo, a grande vantagem do corante ácido foi quando associado ao laser na morte de *S. aureus*.

Tabela 7 - Experimento do efeito bactericida do corante. Análise descritiva

Grupos	Número de bactérias
<i>S. aureus</i> Controle	1,3x10 ⁹
<i>E. coli</i> Controle	1,2x10 ⁹
<i>S. aureus</i> corante normal	6x10 ⁴
<i>S. aureus</i> novo corante	1,4 x10 ⁵
<i>E. coli</i> corante normal	incontável
<i>E. coli</i> novo corante	3,8x10 ⁶
<i>S aureus</i> corante normal + laser	1,2 x 10 ⁵
<i>S aureus</i> novo corante + laser	0
<i>E coli</i> corante normal+ laser	0
<i>E coli</i> novo corante+ laser	incontável

Na Figura 11, estão os resultados de densidade óptica no experimento do efeito bacteriostático dos corantes. A avaliação foi feita 24h após a irradiação.

Letras diferentes = $p < 0,05$.

SaC= *S. aureus* controle; **EcC**= *E. coli* controle; **Sac0**= *S. aureus* e corante convencional; **Ecc0**= *E. coli* e corante convencional; **Sac1**= *S. aureus* e novo corante; **Ecc1**= *E. coli* e novo corante; **Ecc1laser**= *E. coli* e novo corante + laser; **Sac1laser**= *S. aureus* e novo corante + laser; **Ecc0laser**= *E. coli* e corante convencional + laser; **Sac0laser**= *S. aureus* e corante convencional + laser.

Figura 11 - Valores médios de absorbância - Efeito bactericida da terapia fotodinâmica após 24h de sua aplicação

Na Figura 11, no gráfico de *S. aureus*, foi possível observar que o corante ácido sozinho (Sac1) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade bacteriana em relação ao controle (SaC) ($p < 0,05$). Os outros grupos não tiveram diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). No gráfico de *E. coli*, observa-se que o corante convencional (Ecc0), o novo corante (Ecc1) e o novo corante + laser (Ecc1laser) reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle ($p < 0,05$).

Foi feita a transformação em porcentagem dos valores de absorbância para comparação da terapia em ambas as bactérias após 24h de sua aplicação (Figura 12). Nesse gráfico é possível observar que o corante ácido sozinho ou associado ao laser, bem como o corante convencional sozinho reduziram *E. coli* em 59,6%, 52,6% e 74,1%, respectivamente, enquanto que o corante ácido somente, reduziu em 54,3% a *S. aureus*.

Letras diferentes = $p < 0,05$.

Sac0= *S. aureus* e corante convencional; **Ecc0**= *E. coli* e corante convencional; **Sac1**= *S. aureus* e novo corante; **Ecc1**= *E. coli* e novo corante; **Ecc1laser**= *E. coli* e novo corante + laser; **Sac1laser**= *S. aureus* e novo corante + laser; **Ecc0laser**= *E. coli* e corante convencional + laser; **Sac0laser**= *S. aureus* e corante convencional + laser.

Figura 12 - Porcentagem média de morte bacteriana para ambas as bactérias após 24h de aplicação da terapia

5.6 EXPERIMENTO 6 – O NOVO CORANTE À BASE DE AZUL DE METILENO TEM PODER BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO SEMELHANTE AO CORANTE CONVENCIONAL?

A Figura 13 mostra a redução da viabilidade bacteriana após 24h da terapia para cada tipo bacteriano separadamente.

Para *S. aureus*, o corante ácido + laser (Sac1laser) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade bacteriana em relação ao controle (SaC) e também, em níveis comparáveis ao controle negativo com antibiótico (C-Sa) ($p > 0,05$). Já para *E. coli*, tanto o corante convencional + laser (Ecc0laser), quanto o corante ácido + laser (Ecc1laser), reduziram significativamente a viabilidade em relação ao controle (EcC) ($p < 0,05$) em níveis comparáveis ao controle negativo com antibiótico (C-Ec) ($p > 0,05$).

A Figura 14 mostra o efeito da terapia comparando-se as duas bactérias após transformação da absorbância em porcentagem. O corante ácido associado ao laser eliminou 100% de ambas as bactérias, embora em relação ao controle, só tenha tido significância estatística para a *S. aureus* ($p < 0,05$).

Letras diferentes = $p < 0,05$.

SaC= *S. aureus* controle; **EcC**= *E. coli* controle; **Sac0**= *S. aureus* e corante convencional; **Ecc0**= *E. coli* e corante convencional; **Sac1**= *S. aureus* e novo corante; **Ecc1**= *E. coli* e novo corante; **Ecc1laser**= *E. coli* e novo corante + laser; **Sac1laser**= *S. aureus* e novo corante + laser; **Ecc0laser**= *E. coli* e corante convencional + laser; **Sac0laser**= *S. aureus* e corante convencional + laser; **C-Sa**= controle negativo *S. aureus*; **C-Ec**= controle negativo *E. coli*.

Figura 13 - Gráfico com valores de mediana de absorbância para os diversos grupos

Letras diferentes = $p < 0,05$.

Sac0= *S. aureus* e corante convencional; **Ecc0**= *E. coli* e corante convencional; **Sac1**= *S. aureus* e novo corante; **Ecc1**= *E. coli* e novo corante; **Ecc1laser**= *E. coli* e novo corante + laser; **Sac1laser**= *S. aureus* e novo corante + laser; **Ecc0laser**= *E. coli* e corante convencional + laser; **Sac0laser**= *S. aureus* e corante convencional + laser; **C-Sa**= controle negativo *S. aureus*; **C-Ec**= controle negativo *E. coli*.

Figura 14 - Medianas da porcentagem de morte bacteriana para ambas as bactérias após 24h de aplicação da terapia

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho se propôs a apresentar um novo corante de terapia fotodinâmica para uso em Periodontia e os primeiros testes de sua efetividade *in vitro*. A principal aplicação desse corante seria em cirurgias periodontais de regeneração de defeitos ósseos ou de recobrimento radicular com o intuito de limpeza e biomodificação da superfície radicular.

Existem relatos escassos na literatura sobre o uso de aPDT durante cirurgias periodontais. O trabalho de Andrade et al. (2013), mostrou sua utilização na fase não cirúrgica e cirúrgica do tratamento de lesões de furca classe III, porém o foco do trabalho não foi no preenchimento ósseo da furca, uma vez que os dentes foram posteriormente extraídos. Os pesquisadores utilizaram o tecido de granulação formado na furca para análises por PCR. Dentro dos limites de busca da presente pesquisa, não foi encontrado nenhum relato de aPDT em cirurgias de recobrimento radicular, ressectivas ou regeneração de defeitos ósseos. A aplicação mais semelhante seria a aPDT durante cirurgias para tratamento de periimplantite, com intuito de descontaminação dos implantes (HAAS et al., 2000; SHIBLI et al., 2003). Shibli et al. (2003) mostraram em um estudo em cães que a aPDT com azul de toluidina O (100µg/ml e laser 685nm) foi eficaz na descontaminação de implantes seguida de regeneração óssea guiada. Houve preenchimento ósseo e reosseointegração, mostrando a segurança da técnica para uso em procedimentos cirúrgicos.

Em relação aos resultados principais da presente pesquisa, cabe-nos esclarecer que os primeiros testes foram feitos com o novo corante à base de azul de toluidina. Porém os experimentos de óptica mostraram que esse corante mudava sua banda de absorção em 10nm, caindo para 575nm e sem nenhum pico de absorção nas bandas de 630 e 660nm (Figura 4). Essa banda de absorção estaria fora da janela terapêutica que é entre 600 a 900nm. Provavelmente isso ocorreu pela agregação do corante provocada pelo pH ácido. No trabalho de Núñez (2007), vários solventes foram testados para os corantes, sendo que a solução salina mostrou maior agregação do corante, mesmo em baixas concentrações. E, semelhante ao presente estudo, apenas o azul de toluidina apresentou deslocamento do pico máximo de absorção para 590nm.

O novo corante à base de azul de metileno não mudou o espectro de absorção da luz como o toluidina, mantendo picos em torno de 660nm (Figura 6). Porém, a fotodegradação do azul de toluidina (Figura 5) com o laser de 635nm foi mais efetiva que a do metileno (Figura

7) com o laser de 660nm, o que está de acordo com a literatura que mostra que o toluidina é mais citotóxico e as fotoreações ocorrem de forma mais rápida que o metileno (BLÁZQUEZ-CASTRO et al., 2009). A toxicidade no escuro do azul de toluidina é bem marcante, e se observarmos os gráficos de morte bacteriana (Figura 12), os corantes sozinhos (toxicidade no escuro), foram mais efetivos em reduzir as bactérias do que os corantes associados ao laser. Para *S. aureus*, o novo corante à base de toluidina foi mais efetivo, enquanto que para *E. coli* ambos os corantes promoveram redução bacteriana. Devemos lembrar que o laser utilizado foi o de 660nm com o azul de toluidina que não possuía picos de absorbância nesse comprimento de onda. No presente trabalho procuramos utilizar lasers de baixa intensidade comercialmente acessíveis no Brasil, que são os que emitem em 660nm.

Nos gráficos de absorbância (Figuras 4 e 6), é possível observar um pico de absorção na banda de 250nm, que para o metileno corresponde a sua forma leuco-azul de metileno. Núñez (2007), afirmou que em pHs baixos há uma forte tendência de aparecimento das formas leuco que não possuem efeito fotodinâmico. Porém foi possível observar esses picos de absorção tanto nos corantes convencionais, quanto nos de pH ácido. Conforme citado no item 2.2 da revisão de literatura, as formas leuco entram mais facilmente na célula e podem ser re-oxidadas no seu interior. Portanto, a sua existência nos corantes testados não parece um resultado ruim, uma vez que os principais picos de absorbância estavam em 660nm para o metileno.

Núñez (2007) sugere que existe a possibilidade de que nas reações do Tipo II, o corante serve apenas para transferir energia ao oxigênio molecular e não sofre degradação e que a não-degradação da molécula seria desejável, uma vez que o processo poderia ocorrer infinitas vezes. Observando-se novamente os experimentos microbiológicos, o novo corante à base de azul de metileno associado ao laser, apesar de ter mostrado uma taxa degradação lenta no experimento óptico, foi muito mais efetivo que o toluidina na morte bacteriana (100% morte *S. aureus* e *E.coli* quando associado ao laser) após 24h da aplicação (Figura 14). Esse melhor efeito foi pela degradação mais lenta do corante, ou a degradação foi tão rápida quando em contato com as bactérias que houve 100% de morte e esse efeito permaneceu por 24h? Talvez a última pergunta seja a verdadeira, uma vez que notamos um fotocclareamento marcante no metileno, após a aplicação do laser, que não foi observada no toluidina. Ressalta-se que a fotodegradação lenta do metileno ocorreu em uma situação experimental fechada, porém, em sistemas biológicos, os autores são unânimes em dizer que as reações podem ocorrer de forma diversa (BLÁZQUEZ-CASTRO et al., 2009; NÚÑEZ; RIBEIRO;

GARCEZ, 2013). Outra possibilidade é que a maior efetividade na morte bacteriana pelo novo corante à base de metileno tenha ocorrido porque o laser de 660nm tem a banda de absorção ideal para esse corante. Ficou claro que o azul de toluidina, tanto na sua forma convencional quanto na ácida, teve picos menores que 600nm não absorvendo o laser e sua efetividade na morte bacteriana foi apenas na incubação com o corante sozinho. Talvez utilizando-se um laser de 635nm o azul de toluidina pudesse ter efeito igual ou melhor que o metileno na redução bacteriana.

Durante a execução da presente pesquisa houve uma mudança nos parâmetros do laser nos experimentos microbiológicos. Houve aumento da potência de 30mW para 100mW, após comunicação pessoal com o Prof. Dr. Renato Prates que nos alertou que uma maior energia seria mais efetiva para a aPDT. Isso está de acordo com a maioria dos estudos em humanos (Quadro 2), que utiliza potências entre 60 e 100mW. Outras alterações nos estudos microbiológicos, foram a não realização da contagem de unidades formadoras de colônia e o acréscimo de um controle negativo com antibiótico no experimento 6 (corantes à base de azul de metileno). O experimento 5 com azul de toluidina serviu como um estudo piloto com o novo corante, sendo que os experimentos posteriores foram melhorados. A não realização de contagem de unidades formadoras de colônia deveu-se ao fato de no experimento 5, haver a formação de colônias incontáveis, somado à falta de tempo hábil para realizar novas diluições e contagens. Porém, pretendemos utilizar essa metodologia nos futuros experimentos.

Discutindo-se o efeito da terapia em relação às bactérias Gram positivas (*S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli*), os resultados do presente estudo não deixaram claro se corantes foram mais eficazes para um tipo ou outro. Ressalta-se que a comparação entre os corantes não foi feita no mesmo ensaio, o que permitiria uma melhor comparação do fator corante. Parece que o azul de toluidina convencional foi mais efetivo para *E. coli* quando usado sem o laser (Figura 12) ou associado ao laser (Tabela 7). O novo corante à base de azul de toluidina associado ao laser foi mais efetivo para *S. aureus* (Tabela 7). O novo corante à base de metileno com o laser eliminou as duas espécies em 100% (Figuras 12 e 14). As bactérias Gram negativas como a *E. coli* possuem uma parede celular mais resistente com membrana citoplasmática, uma camada fina de peptidoglicanos e uma membrana externa. As Gram positivas possuem um envelope de duas camadas com a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicanos mais espessa. Os produtos da reação fotodinâmica tem um tempo de vida rápido e levam mais tempo para atravessar a membrana mais espessa das Gram positivas. Há necessidade de uma concentração maior de corante para promover rompimento e vazamento

dos constituintes celulares das Gram negativas. Nas Gram positivas a destruição da membrana é mais rápida, porém o vazamento das estruturas é mais lento devido à espessura da camada lipídica (ROMANOVA et al., 2003). Esses fatores pareceram não interferir na morte bacteriana pelo novo corante à base de azul de metileno associado ao laser.

Diversos são os mecanismos de ligação dos corantes às bactérias, sendo que o toluidina liga-se melhor aos lipopolissacarídeos e produz mais oxigênio singlete, enquanto que o metileno liga-se às porinas das paredes celulares. No presente estudo essas diferenças não foram relevantes, uma vez que o melhor resultado obtido foi com o novo corante à base de metileno + laser reduzindo em 100% tanto a *E. coli* quanto *S. aureus*. É complicado inferir qual dos mecanismos foi responsável pela morte de ambas espécies bacterianas, uma vez que existem tantas variáveis. Podemos sugerir que possam existir mecanismos alternativos, como ocorrência simultânea de reações tipo I e tipo II, fotoativação dos dímeros do corante concomitante à dos monômeros, destruição celular via LPS ou porinas, ou simplesmente a ação do ácido destruindo a parede bacteriana.

Os resultados dos testes de desmineralização em dentes bovinos mostraram que o novo corante promoveu perda de dureza e desgaste semelhantes aos promovidos pelo ácido cítrico mais tetraciclina (Tabelas 2 e 3). E ainda, que o tempo de aplicação de 180s foi o que promoveu um desgaste mais significativo (Tabela 5 e Figura 3). Apesar de ainda não terem sido feitos testes com o tempo de pré-irradiação do novo corante, sugerimos que o tempo total (pré-irradiação mais irradiação) não ultrapassasse esse período de 180s. No experimento de biocompatibilidade das superfícies tratadas pelo corante, houve crescimento celular semelhante ao corante convencional e ao controle, mostrando que o novo corante é biocompatível (Figuras 9 e 10). Nesse experimento nota-se um desvio padrão alto no gráfico que é inerente à metodologia da pesquisa porque as células se distribuem de forma irregular na superfície da dentina.

O pH ácido do novo corante pode ter efeitos negativos e positivos. Um efeito negativo é que o pH pode influenciar a produção de espécies reativas de oxigênio. Bonneau et al. (1975) mostraram que a produção de oxigênio singlete é cinco vezes mais eficiente em meio básico que em meio ácido. Um estudo mais novo mostrou que, em pH4, o metileno torna-se protonado de forma mais rápida do que a reação com oxigênio, porém em questão de nanossegundos, formam-se tripletos (MBH^{2+}) que possuem um alto nível de energia e reagem com o oxigênio numa taxa menor. Eles permanecem mais tempo em uma solução homogênea, mas produzem menos oxigênio singlete (TARDIVO et al., 2005), o que confirma a afirmação

do estudo anterior. A tese de Núñez (2007) mostrou que existe uma queda de pH após a dissolução dos fotossensibilizadores em água e em soro fisiológico. A autora também discute a redução na velocidade do oxigênio singleto em meio ácido sendo que em pH8,5 seria 20 vezes mais rápida que em pH3. Também foi citado que em baixos pHs existe forte tendência de formação do leuco-azul de metileno (forma reduzida do corante), a qual não tem efeito fotodinâmico. Porém, na presença de oxigênio ele retorna à sua forma inicial. No artigo de Blázquez-Castro et al. (2009), o corante na sua forma leuco tem entrada facilitada na célula, conforme explicado na revisão de literatura do presente trabalho. A forma leuco deve ser re-oxidada no interior da célula para exercer o efeito fotodinâmico.

Outro ponto negativo da desmineralização dentária provocada pelo novo corante seria a liberação de íons cálcio no meio. Usacheva et al. (2006) mostraram que os íons cálcio, por serem positivos podem ocupar os sítios aniônicos de ligação presentes nas bactérias competindo com os corantes que também são catiônicos. Tal ligação reduz a efetividade da terapia fotodinâmica, reduzindo a morte bacteriana. O azul de toluidina liga-se rapidamente aos sítios aniônicos dos LPS bacterianos, o que seria impedido pelo cálcio do meio. Já o metileno liga-se preferencialmente a proteínas de membrana, portanto a interação LPS-Cálcio não prejudicaria tanto sua fototoxicidade. Porém, esses autores encontraram uma maior inibição da morte bacteriana pelo metileno na presença de cálcio. A *E. coli* possui uma grande variedade de porinas cátion-seletivas que atraem principalmente o azul de metileno que é mais hidrofílico. Uma sugestão seria que os íons cálcio se ligariam primeiramente com os LPS, deixando os sítios das proteínas ainda livres para a ação do corante. E ainda, podem existir mecanismos de interação corante-bactérias totalmente desconhecidos ou vias alternativas de entrada do corante na célula bacteriana. Outra possibilidade é que a desmineralização dentária libera outros elementos além do cálcio como flúor, fósforo, oxigênio, silício, magnésio, sódio e possam ocorrer reações químicas entre eles antes que os cátions ocupem todos os sítios de ligação dos corantes.

Entre os efeitos positivos do corante com pH ácido está o efeito bactericida, comumente provocado por ácidos orgânicos como o ácido cítrico. Eles causam rompimento da membrana celular permitindo a entrada de hidrogênio e outros compostos na célula contribuindo para sua destruição (KIM; RHEE, 2013). Talvez a morte bacteriana de 100% obtida no presente estudo com o novo corante à base de azul de metileno associado ao laser, seja devido ao efeito do ácido no rompimento da membrana celular facilitando a entrada do corante na célula. Dessa forma o corante entraria em sua forma oxidada (colorida) sem a

necessidade de alternar para a forma leuco. Ainda assim, trata-se apenas uma sugestão, uma vez que não sabemos se os corantes com pH ácido comportam-se como os ácidos orgânicos.

Outro ponto positivo do corante com pH ácido, seria seu efeito de desmineralização da superfície dentária conforme exposto nos primeiros experimentos do presente trabalho. Bumb et al. (2014), verificaram num trabalho de endodontia a profundidade de ação da aPDT nos túbulos dentinários via canal. Os canais foram contaminados com *E. faecalis* e tratados com azul de metileno (25mg/ml) e laser diodo 910nm. Os resultados mostraram uma penetração de bactérias da ordem de 980µm e a aPDT foi capaz de reduzir as bactérias em 97% e eliminá-las a uma distância de até 900µm. Adriaens, De Boeve e Loesche (1988) mostraram que em dentes com doença periodontal há penetração bacteriana no cimento e em áreas de dentina exposta, em até 300µm de distância. Baseando-se nesses fatos, podemos sugerir que o novo corante, com efeito ácido seria capaz de abrir os túbulos dentinários, permitindo uma maior penetração do corante, uma vez que os túbulos são de menor diâmetro no lado externo da raiz. Além, disso, estudos mostraram que a aPDT é capaz de agir nos lipopolissacarídeos, reduzindo seu efeito indutor de liberação de citocinas pró-inflamatórias, e em proteases bacterianas, reduzindo em até 94% a sua capacidade proteolítica (KÖMERIK; WILSON; POOLE, 2000). Os lipopolissacarídeos bacterianos são encontrados ao longo da superfície do cimento de dentes contaminados por doença periodontal, com concentração maior na junção cimento-dentina, podendo até penetrar na dentina (VIEIRA, 1975). Diante disso, a entrada do corante e a ação bactericida em distância, podem ser benéficas.

Ainda sobre a desmineralização provocada pelo corante ácido, na presente pesquisa, os resultados foram semelhantes ao provocado pelo ácido cítrico com tetraciclina. A abertura dos túbulos pode causar hiperestesia dentinária, porém nas cirurgias periodontais de recobrimento radicular ou preenchimento de defeitos ósseos, a área desmineralizada é recoberta pelo retalho e não fica exposta. Barros (2013), mostrou que áreas de recessão gengival tratadas por enxerto conjuntivo subepitelial associado ao ácido cítrico + tetraciclina ou raspagem somente, mostraram significativa redução da sensibilidade radicular após 7 dias da cirurgia (próxima de zero) e com resultados estáveis por 12 meses. O uso de condicionamento radicular nesse estudo resultou em significativo aumento da faixa de mucosa ceratinizada, sendo praticamente 2x maior que o grupo controle (raspagem) após 12 meses.

É preciso ressaltar que todos os experimentos do presente estudo foram realizados em condições controladas de um estudo *in vitro*. Tais experimentos são fundamentais para se conhecer os efeitos isolados do novo corante, porém não se pode esquecer que o objetivo final

é seu uso clínico. Sendo assim, é importante citar que numa situação clínica as bactérias estão organizadas em biofilmes e o FS não consegue difundir para as regiões mais internas, tendo um efeito reduzido (TEIXEIRA et al., 2012). Os estudos em cultura planctônica mostram efetividade da aPDT 2 vezes maior que em biofilmes (FONTANA et al., 2009). Em Periodontia, há a vantagem de se poder desagregar os biofilmes com raspagem e alisamento radicular, favorecendo o efeito da aPDT. Outro fator importante em clínica é que a presença de soro e saliva podem modificar a fotoquímica dos corantes. Núñez (2007) mostrou que o soro e a saliva geram uma redução na banda de absorção dos corantes de 12nm e 3nm respectivamente. Porém, um estudo *in vitro* mostrou que a aPDT com LED e azul de toluidina foi efetiva na morte de bactérias periodontopatogênicas, sem interferência da adição de soro à cultura (EICK et al., 2013).

Discutindo-se ainda os efeitos clínicos da aPDT, alguns autores afirmam que existe a possibilidade de a terapia fotodinâmica antimicrobiana, ter um efeito secundário na aceleração da reparação, uma vez que o laser em baixa intensidade é utilizado. Estudos de nosso grupo demonstraram que a aplicação do laser em baixa intensidade é capaz de aumentar a produção de fatores de crescimento envolvidos na reparação (DAMANTE et al., 2009; KARAM et al., 2013). Parte da energia não absorvida pelo corante pode agir nos tecidos aumentando a circulação local, favorecendo o processo de reparo e a produção de proteínas. Porém esse efeito é apenas sugestão de alguns autores em estudos com animais (de ALMEIDA et al., 2008; PRATES et al., 2011). Os leitores mais céticos em relação ao laser certamente irão refutar essa teoria de imediato. Porém, qual seria a explicação para alguns estudos em humanos não mostrarem diferenças clínicas com o uso da aPDT, mas apresentarem diferenças significantes na redução de mediadores inflamatórios? Estudos mostraram melhora na hemoglobina glicosilada de pacientes diabéticos (AL-ZAHRANI et al., 2009), redução de IL-1 β (LUCESI et al., 2013) e MMP-8 (QUEIROZ et al., 2015), aumento de fatores de crescimento (FRANCO et al., 2014) e expressão de genes que regulam o metabolismo ósseo (ANDRADE et al., 2013; FRANCO et al., 2014) sem mudanças clínicas significantes. Talvez o efeito de fototerapia realmente ocorra. Também existe a possibilidade da aplicação do laser em baixa intensidade como fototerapia com o intuito de aceleração da reparação logo após, ou intercaladamente às sessões de aPDT.

No presente momento ainda existem muitas dúvidas a se resolver. Sugestões de físicos e químicos podem sanar muitas delas, e mesmo assim, existem possibilidades infinitas de pesquisa com o novo corante. Entre elas, investigar a capacidade de gerar oxigênio singlete

e espécies reativas de oxigênio; efeito em biofilmes de bactérias periodontopatogênicas; capacidade bactericida em comparação ao ácido cítrico + tetraciclina; efeito da aPDT após adição de cálcio ao meio de cultura bacteriano; estudos histológicos em animais com periodontite induzida verificando-se a reação tecidual ao corante e a quantidade de formação óssea promovida pelo tratamento, entre outras. Acreditamos que o uso do corante com pH ácido associado ao laser na forma de aPDT pode ser vantajoso por aliar o efeito de desmineralização superficial com a eliminação de bactérias.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O novo corante à base de azul de toluidina com pH ácido promoveu desmineralização e desgaste na superfície de dentina, sendo que tempos maiores de aplicação foram mais efetivos. Sua banda de absorção foi reduzida em relação ao corante convencional, enquanto que o novo corante à base de azul de metileno com pH ácido manteve a mesma banda de absorção, a qual é mais compatível com os lasers do mercado. Sua biocompatibilidade foi semelhante à do corante convencional não mostrando toxicidade em cultura de células. O novo corante à base de azul de metileno quando associado ao laser promoveu morte bacteriana. Portanto, é possível concluir que o novo corante com pH ácido causa desmineralização dentária, é biocompatível e capaz de promover morte bacteriana.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial Invasion in Root Cementum and Radicular Dentin of Periodontally Diseased Teeth in Humans. *J Periodontol.* 1988;59(4):222-30.
- Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* In press 2014.
- Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):801-7.
- Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol.* 2009;80(10):1568-73.
- Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant'ana AC, Greggi SL, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(5):469-75.
- Andrade PF, Garlet GP, Silva JS, Fernandes PG, Milanezi C, Novaes AB Jr, et al. Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: a human study. *J Photochem Photobiol B.* 2013;126:119-25.
- Arenas Y, Monro S, Shi G, Mandel A, McFarland S, Lilge L. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(4):615-25.
- Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, Skurska A, Dolińska E, Heumann C, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig.* 2014;18(9):2129-35.
- Atieh MA. Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2010;25(4):605-13.
- Attin T. Methods of assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:152-72.
- 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.

- Balata ML, Andrade LP, Santos DB, Cavalcanti AN, Tunes Uda R, Ribeiro Édel P, et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(2):208-14.
- Barros JPC. Efeitos do condicionamento ácido na descontaminação da superfície radicular e no recobrimento radicular: análise em MEV e estudo clínico randomizado [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.
- Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, Mashmouly S, Fekrazad R, Chiniforush N, et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013;40(1):65-72.
- Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med.* 2012;8:12.
- 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;41(6):573-81.
- Blázquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Juarranz A. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(3):371-6.
- Bonneau R, Pottier R, Bagno O, Joussot-Dubien J. pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using thiazine dyes as photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 1975;21(3):159-63.
- Bonstein T, Mikulski LM, Bush MA, Bush PJ. Photoactivated disinfection of *Streptococcus intermedius* through dentin disc at clinically relevant intervals: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2010;55(10):771-7.
- Boyko GA, Brunette DM, Melcher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. *J Periodont Res.* 1980;15(3):297-303.
- Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009;80(11):1790-8.
- Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008;35(10):877-84.
- Bumb SS, Bhaskar DJ, Agali CR, Punia H, Gupta V, Singh V, et al. Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):ZC67-71.

Caetano W, Haddad PS, Itri R, Severino D, Vieira VC, Baptista MS, et al. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir*. 2007;23(3):1307-14.

Campanile VSM, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):27-34.

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;28(1):317-24.

Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2012;27(5):979-86.

Chitsazi MT, Shirmohammadi A, Pourabbas R, Abolfazli N, Farhoudi I, Daghigh Azar B, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with non-surgical treatment in aggressive periodontitis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014;8(3):153-9.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):681-8.

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008;79(9):1638-44.

Daly CG. Antibacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces. In vitro. *J Clin Periodont* 1982;9(5):386-92.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):885-91.

Damante CA, Karam PSBH, Oliveira RC, Greghi SLA, Rezende MLR, Sant'Ana ACP. Influence of medium conditioned by roots treated with laser. *Lasers Med Sci* 2013;28(6):1417.

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* 2008;79: 2156-65.

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;26(3):359-67.

de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol.* 2007;78(6):965-73.

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;80(1):98-105.

de Rezende ML, Coesta PT, de Oliveira RC, Salmeron S, Sant'Ana AC, Damante CA, et al. Bone demineralization with citric Acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. *J Periodontol.* 2015;86(1):146-54.

Dilsiz A, Canakci V, Aydin T. Clinical effects of potassium-titanyl-phosphate laser and photodynamic therapy on outcomes of treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013;84(3):278-86.

Ducati P, Salmeron S, Fiocchi AA, Magalhães AC, Rezende MLR, Santana ACP, et al. Efeito da terapia fotodinâmica na desmineralização superficial do esmalte e da dentina radicular bovinos in vitro. *Braz Dent J.* 2013;27:108.

Eick S, Markauskaite G, Nietzsche S, Laugisch O, Salvi GE, Sculean A. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(2):156-67.

Feist IS, De Micheli G, Carneiro SR, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol.* 2003;74(9):1368-75.

Fernandes LA, Martins TM, de Almeida JM, Theodoro LH, Garcia VG. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):237-43.

Ferreira R, Karam PSBH, Oliveira RC, Gregghi SLA, Santana ACP, Zangrando MSR, et al. Influência da modificação da biocompatibilidade radicular na proliferação de fibroblastos gengivais humanos. *Braz Oral Res.* 2014; 28(Supplement 1):47, AO060.

Fine DH, Morris ML, Tabak L, Cole JD. Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth. *J Periodontal Res.* 1980;15(1):10-9.

- Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009;44(6):751-9.
- 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;11(1):41-7.
- Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghashtanli NA, Itri R, Hamblin MR, et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(4):483-90.
- Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011;38(12):1106-14.
- Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.* 2013;84(4):556-65.
- Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2014;49(5):584-94.
- Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, Xie Y, Liu D. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):33-7.
- Giannelli M, Formigli L, Lorenzini L, Bani D. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2012;39(10):962-70.
- Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of photodynamic therapy, diode laser, and deep scaling on cytokine and acute-phase protein levels in gingival crevicular fluid of residual periodontal pockets. *J Periodontol.* 2012;83(8):1018-27.
- Gois MM, Kurachi C, Santana EJ, Mima EG, Spolidório DM, Pelino JE, et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2010;25(3):391-5.
- Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010a;28 Suppl 1:S53-60.

Goulart RC, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010b;28 Suppl 1:S85-90.

Haas R, Baron M, Dörtbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(3):374-82.

Hanes PJ, Polson AM. Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. *J Periodont*. 1989; 60(4):188-98.

Jung GU, Kim JW, Kim SJ, Pang EK. Effects of adjunctive daily phototherapy on chronic periodontitis: a randomized single-blind controlled trial. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(6):280-7.

Karam PSBH, Cunha PO, Ferreira R, Figueiredo CM, Sant'Ana ACP, Rezende MLR, et al. Stimulation of growth factors secretion by low intensity laser and LED. Florence, 2013, p. 9-13. *Laser Florence 2013 – Guidelines on laser medicine world – Dermatology plastic surgery, neurology, dentistry*. Bolonha: Editográfica; 2013. v. 1, p. 9-13.

Karam PSBH. Influência de raízes tratadas quimicamente e com laser sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos e granulação óssea [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.

Kim SA, Rhee MS. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(21):6552-60.

Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X, Holewa C, Patel C, Kent R, Amiji MM, Soukos NS. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):600-6.

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;85(8):e277-86.

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*. 2000;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;47(3):932-40.

- Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;294(2):133-40.
- 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;40(8):781-8.
- Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011;46(1):89-96.
- Lulic M, Leiggenger Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):661-6.
- Macedo GO, Novaes AB Jr, Souza SL, Taba M Jr, Palioto DB, Grisi MF. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized, controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):881-6.
- Mattiello FD, Coelho AA, Martins OP, Mattiello RD, Ferrão Júnior JP. In vitro effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus sanguinis*. *Braz Dent J*. 2011;22(5):398-403.
- Mongardini C, Di Tanna GL, Pilloni 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;29(1):1-8.
- 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*. In press 2014.
- Nakoneczna J, Grinholc M. Photodynamic inactivation requires innovative approach concerning numerous bacterial isolates and multicomponent sensitizing agents. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(4):359-61.
- Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2012;44(4):296-302.
- Novaes AB Jr, Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci*. 2012;27(2):389-95.
- Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de ortotoluidina com relação à eficiência fotodinâmica [tese]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2007.

- Núñez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. PDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
- Passanezi E, Damante CA, de Rezende ML, Greggi SL. Lasers in periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):268-91.
- Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova*. 2007;30(4):988-94.
- Pessoa LC. Análise microbiológica antes e após terapia fotodinâmica em paciente com pigmentações dentárias oriundas de bactérias produtoras de pigmento escurecido [monografia especialização]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.
- Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*. In press 2014.
- Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LM, Adabo MD, Lopes T, do Carmo TH, et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci*. 2010;25(1):87-91.
- Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(7):575-80.
- Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing (II). Citric treatment of the denuded root. *J Clin Periodontol* 1982;9(6):441-54.
- Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol*. 1983;54(3):141-47.
- Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol*. 1984;55(8):443-6.
- Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, et al. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2014;85(9):1222-9.
- Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, et al. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(12):835-44.
- Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2008;43(2):162-7.

- Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: microbiological results. *J Photochem Photobiol B*. 2014;141:170-5.
- Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, Oliveira FS, Novaes AB Jr, Taba M Jr, et al. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):617-25.
- Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):685-94.
- Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. Optimum range. *J Periodont* 1975;46(11):646-55.
- Rezende ML, Consolaro A, Sant'Ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Passanezi E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. *J Periodontol*. 2014;85(5):e121-9.
- Romanova NA, Brovko LY, Moore L, Pometun E, Savitsky AP, Ugarova NN, et al. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(11):6393-8.
- Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, et al. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients-a clinical study. *Clin Oral Investig*. 2010;14(6):637-44.
- Salmeron S, Rezende ML, Consolaro A, Sant'Ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Passanezi E. Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol*. 2013;84(5):641-9.
- Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E, de Rezende ML. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. *J Periodontol*. 2007;78(10):2007-17.
- Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, et al. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B*. 2010;101(3):348-54.
- Sekiguchi RT, Fukuda CT, Damante CA, De Micheli G, Lotufo RFM. Antibiotic resistance alert in periodontology. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36(4):299-304.
- Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2013a;28(2):669-82.

- 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*. 2013b;40(5):514-26.
- Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci*. 2003;45(1):17-23.
- Shih MH, Huang FC. Repetitive methylene blue-mediated photoantimicrobial chemotherapy changes the susceptibility and expression of the outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4):664-71.
- Sigus BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010;81(7):975-81.
- Sorkhdini P, Moslemi N, Jamshidi S, Jamali R, Amirzargar AA, Fekrazad R. Effect of hydrosoluble chlorine-mediated antimicrobial photodynamic therapy on clinical parameters and cytokine profile in ligature-induced periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 2013;84(6):793-800.
- Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):143-66.
- Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG, Goodson JM. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1391-6.
- Souza SL, Andrade PF, Silva JS, Tristão FS, Rocha FA, Palioto DB, et al. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(2):65-71.
- Späth A, Leibl C, Cieplik F, Lehner K, Regensburger J, Hiller KA, et al. Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers. *J Med Chem*. 2014;57(12):5157-68.
- Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem Photobiol*. 2012;88(1):227-32.
- Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175-91.

Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3202-9.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res*. 2012;46(6):549-54.

Terranova VP, Martin GR. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J Periodont Res*. 1982;17:530-3.

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;27(4):687-93.

Usacheva MN, Teichert MC, Sievert CE, Biel MA. Effect of Ca⁺ on the photobactericidal efficacy of methylene blue and toluidine blue against gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides. *Lasers Surg Med*. 2006;38(10):946-54.

Vieira MM. Modificações estruturais na superfície radicular exposta a doença periodontal: avaliações clínicas, histológicas e histoquímicas em dentes humanos [tese]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas; 1975.

Vilela SF, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2012;57(6):704-10.

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o pedido de patente sob título: **"NOVO CORANTE PARA TERAPIA FOTODINÂMICA EM ODONTOLOGIA"**, desenvolvido pela Profa. Dra. Carla Andreotti Damante, lotada na Faculdade de Odontologia de Bauru da USP, encontra-se nesta Agência USP de Inovação, segundo processo RUSP: 13.1.1139.25.2, em fase de redação e subsequente depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

São Paulo, 09 de dezembro de 2014.

Maria Aparecida de Souza
Dir. Téc. Propr. Intelectual

AGÊNCIA USP INOVAÇÃO

RUA DA TORRES DE OLIVEIRA, 78- JAGUARÉ - SÃO PAULO - S.P. - CEP: 05347-952
TEL.: (11) 5719.3656 - <http://www.usp.br/innovacao> - e-mail: inovacao@usp.br

ANEXO B

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E TRATAMENTOS QUÍMICOS NA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS SOBRE A SUPERFÍCIE RADICULAR

Pesquisador: Carla Andreotti Damante

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09481614.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 721.759

Data da Relatoria: 25/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental realizado com fragmentos de raízes humanas, em que será verificada a capacidade de adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanos, sob a influência de diferentes tratamentos. Será empregada a PDT (Terapia Fotodinâmica) utilizando o azul de toluidina com dois diferentes pH, comparados aos métodos tradicionais de tratamentos radiculares além do controle negativo, sem tratamento. Esse estudo foi motivado pela ação da PDT já relatada em trabalho anterior da autora, em que se observou uma alteração estrutural dentinária, que poderia ser semelhante ao que se obtém com os métodos tradicionais de tratamento periodontal.

Objetivo da Pesquisa:

Pretende-se verificar com este estudo, se a terapia fotodinâmica permite tornar a superfície radicular biocompatível com a inserção de fibroblastos gengivais humanos em níveis comparáveis aos obtidos com o ácido cítrico e melhores que o EDTA e ácido fosfórico, normalmente usados como adjuntos da terapia periodontal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não implica em riscos uma vez que é in vitro. Quanto aos pacientes que doarão os

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 721.759

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 14.7.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. No entanto solicita-se à pesquisadora o atendimento descrito no item "Recomendações" e "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações". Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final.

BAURU, 17 de Julho de 2014

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br