

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos de
ciclos de terapia fotodinâmica.**

Aluno: Lucas Henrique de Paula Zago

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Raquel Fontana

Araraquara-SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica.

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia, da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Aluno: Lucas Henrique de Paula Zago

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Raquel Fontana

Araraquara-SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Z18a

Zago, Lucas Henrique de Paula.

Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica / Lucas Henrique de Paula Zago. – Araraquara, 2018.

101 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em Microbiologia.

Orientadora: Carla Raquel Fontana.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Resistência bacteriana. 3. Doença periodontal. 4. Fotossensibilizador. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Márcia e João em uma singela tentativa de
retribuir o que já fizeram por mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelos meus familiares e amigos. Por iluminar meus caminhos permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Márcia e João, por me darem a oportunidade de estudar, pelo incentivo e por não medirem esforços para eu alcançar minha felicidade. Minha eterna gratidão, espero um dia poder retribuir.

A minha orientadora, Prof. Carla Raquel Fontana, pela oportunidade que me concedeu, pela paciência e serenidade ao passar seus ensinamentos como professora e ser humano, por sua bondade e dedicação. Peço desculpas pelos meus erros, falhas, falta de experiência e minhas limitações. Obrigado pela orientação.

A minha namorada Ana Claudia, pelo incentivo, compreensão, apoio incondicional em diversos momentos difíceis e por sempre estar disposta a me ajudar. Sem você tudo seria mais difícil.

A Prof. Paula Barbugli pela ajuda, ensinamentos e colaboração em etapas fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A Prof. Magda feres e a técnica Izilvania, por terem sido tão solícitas e prestativas, colaborando para realização das análises moleculares deste trabalho.

Aos amigos de laboratório de microbiologia, Sarah, Malu, Laura, Laís, Virginia e Willian pelos momentos de confraternização e angústia compartilhados durante a pós-graduação e pela ajuda nos experimentos e troca de experiências. Agradeço pela amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia, pelo aprendizado científico passado durante as aulas.

As funcionárias da seção de pós-graduação, pelo auxílio aos alunos sempre que necessário, respondendo os e-mails rapidamente, nos recebendo e atendendo com atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de pesquisa concedida, indispensável para que este trabalho alcançasse os resultados aqui apresentados. Processo número 2016/10310-5.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento parcial desta pesquisa, também indispensável para realização do presente trabalho.

*“Coragem é o que é preciso para
se levantar e falar, a coragem é também o que
é preciso para sentar e ouvir”*

Winston Churchill

Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica

Resumo

A doença periodontal é um processo patológico infecto-inflamatório, que pode causar eventual perda do elemento dental. O principal tratamento realizado é a raspagem e alisamento radicular (RAR), que embora seja efetiva, tem como fator limitante a dificuldade técnica de intervir em biofilmes de áreas de difícil acesso. As associações com antibióticos podem ocasionar efeitos colaterais e em bactérias resistentes podem ser ineficazes. Desta forma, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) surge como uma opção adjuvante, para o tratamento das doenças periodontais. Este trabalho investigou, *in vitro*, o potencial de redução e desenvolvimento de resistência bacteriana, em um pool clínico resistente ao metronidazol, frente a múltiplos ciclos de TFDa, em fase planctônica e biofilme, utilizando azul de metileno, clorina-e6 e curcumina, como fotossensibilizadores (FS). Para realização dos ciclos de indução de resistência, foi necessário encontrar as condições sub ótimas da TFDa, através da quantificação das colônias formadas por mililitro de amostra (UFC/mL). Os seguintes parâmetros foram encontrados em fase planctônica: 50 µg/mL de azul de metileno e dose de luz de 120 J/cm² com redução de 1,67 log₁₀, clorina-e6 e curcumina obtiveram reduções de 1,91 log₁₀ e 1,76 log₁₀, respectivamente, com dose de luz de 25 J/cm² e 100 µg/mL de FS. Posteriormente o *pool* de bactérias foi sujeito a múltiplas exposições de TFDa, seguido de um período de recuperação, em que células bacterianas sobreviventes foram submetidas novamente ao mesmo tratamento, e assim sucessivamente até que se observasse ou não o desenvolvimento de resistência ou até o limite de 15 ciclos. Para o azul de metileno e clorina-e6, houve eliminação total dos micro-organismos ao fim do 5º ciclo e para curcumina ao fim do 3º ciclo. Em biofilme, a dose sub ótima de TFDa com azul de metileno foi de 150 µg/mL + 150 J/cm² com uma redução de 2,53 log₁₀. Para clorina-e6 e curcumina a dose sub ótima foi de 150 J/cm² associada a 100 µg/mL de cada FS, com as respectivas reduções: 1,47 log₁₀; 1,88 log₁₀. Foram aplicados 15 ciclos de TFDa, que apesar de não reduzirem por completo a carga microbiana, foram capazes de promover um aumento significativo na morte bacteriana. Os resultados indicam que a TFDa pode ser uma abordagem adjuvante promissora no tratamento da doença periodontal.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, resistência bacteriana, doença periodontal, fotossensibilizador.

Evaluation of bacterial reduction and resistance after multiple cycles of photodynamic therapy

Abstract

Periodontal disease is an infectious-inflammatory pathological process, which can cause eventual loss of the dental element. The main treatment is scaling and root planing (RAR), which, although effective, has as a limiting factor the technical difficulty of intervening in biofilms of difficult access areas. Associations with antibiotics can cause side effects and in resistant bacteria they may be ineffective. In this way, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) appears as an adjuvant option for the treatment of periodontal diseases. This study investigated, *in vitro*, the potential for reduction and development of bacterial resistance in a clinical pool, resistant to metronidazole, against multiple cycles of aPDT in planktonic phase and biofilm using methylene blue, chlorine-e6 and curcumin as photosensitizers (PS). For resistance induction cycles, it was necessary to find the sub optimal conditions of the aPDT, by quantifying the colonies formed per milliliter of sample (CFU/mL). The following parameters were found in the planktonic phase: 50 µg/mL methylene blue and light dose of 120 J/cm² with a reduction of 1.67 log₁₀, chlorine-e6 and curcumin obtained reductions of 1.91 log₁₀ and 1.76 log₁₀, respectively, with light dose of 25 J/cm² and 100 µg/mL PS. Subsequently, the pool of bacteria was subjected to multiple exposures of aPDT, followed by a recovery period, in which surviving bacterial cells were resuspended in the same treatment, and so on until resistance development was observed or up to the limit of 15 cycles. For methylene blue and chlorine-e6, the microorganisms were completely eliminated at the end of the 5th cycle and for curcumin at the end of the third cycle. In biofilm, the sub optimal dose of methylene blue aPDT was 150 µg/mL + 150 J/cm² with a reduction of 2.53 log₁₀. For chlorine-e6 and curcumin the sub optimal dose was 150 J/cm² associated with 100 µg/mL of each PS, with respective reductions: 1.47 log₁₀; 1.88 log₁₀. Fifteen cycles of aPDT were applied, which although not completely reducing the microbial load, were able to promote a significant increase in bacterial death. The results indicate that aPDT may be a promising adjuvant approach in the treatment of periodontal disease.

Key words: photodynamic therapy, bacterial resistance, periodontal disease, photosensitizer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Complexos bacterianos na doença periodontal.	17
Figura 2 – Esquema ilustrativo sobre o mecanismo de ação tipo 1 e tipo 2 na terapia fotodinâmica.	21
Figura 3 – Estágios de formação do biofilme.	24
Figura 4– Estrutura química dos fotossensibilizadores	31
Figura 5– Espectros de absorção UV-Visível dos fotossensibilizadores	31
Figura 6– Sistema de iluminação LED – 660 nm	32
Figura 7– Sistema de iluminação LED – 450 nm	33
Figura 8- Representação da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana a TFDa.	34
Figura 9– Reação de óxido-redução da resazurina.	42
Figura 10 - Ação do azul de metileno no escuro sobre os micro-organismos	46
Figura 11 - Ação da TFDa com azul de metileno	46
Figura 12 - Ação da TFDa com azul de metileno	47
Figura 13 - Ação da TFDa com azul de metileno	47
Figura 14 - Ação da clorina-e6 no escuro sobre os micro-organismos	49
Figura 15 - Ação da TFDa com clorina-e6	50
Figura 16 - Ação da TFDa com clorina-e6	50
Figura 17- Ação da curcumina no escuro sobre os micro-organismos	52
Figura 18- Ação da TFDa com curcumina	53
Figura 19- Ação da TFDa com curcumina	54
Figura 20– Viabilidade celular azul de metileno	55
Figura 21– Viabilidade celular clorina-e6	56
Figura 22– Viabilidade celular curcumina	57
Figura 23– Ciclos consecutivos de TFDa com azul de metileno	58
Figura 24– Ciclos consecutivos de TFDa com clorina-e6	59
Figura 25– Ciclos consecutivos de TFDa com curcumina	59
Figura 26- Ação da TFDa com azul de metileno	62
Figura 27- Ação da TFDa com clorina-e6	64
Figura 28- Ação da TFDa com clorina-e6	64
Figura 29- Ação da TFDa com clorina-e6	65
Figura 30 - Ação da TFDa com curcumina	66
Figura 31- Ação dos FS no escuro sobre os micro-organismos	67
Figura 32- Ciclos consecutivos de TFDa com curcumina	70
Figura 33– Quantificação da biomassa total após TFDa com azul de metileno	71
Figura 34– Quantificação da biomassa total após TFDa com clorina-e6	72
Figura 35– Quantificação da biomassa total após TFDa com curcumina	72
Figura 36– Biofilmes analisados por CLSM	74
Figura 37– Internalização dos fotossensibilizadores no biofilme	78
Figura 38- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, sem tratamento	80
Figura 39- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, azul de metileno	81
Figura 40- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, clorina-e6	82
Figura 41- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, curcumina	83
Figura 42– Teste de sensibilidade ao metronidazol	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções estoque e de trabalho dos fotossensibilizadores utilizadas.....	32
Tabela 2- Parâmetros experimentais do estudo em fase planctônica	36
Tabela 3- Parâmetros experimentais do estudo em fase de biofilme	37
Tabela 4– Relação das sondas bacterianas empregadas. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998)	40
Tabela 5 – Índice utilizado para determinação dos níveis dos micro-organismos nas amostras.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BHI	Brain heart infusion
BBL	Extrato de levedura
Cél.	célula (s)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
cm	centímetro(s)
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
ELISA	Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
g/L	grama por litro
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
J	Joule
LPS	Lipopolissacarídeo
LED	<i>Light Emitting Diodes</i>
mg	miligrama
mm	milímetro(s)
mW	miliwatt
nm	nanômetro(s)
Ns	Não significativo
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão fosfato salino
RAR	raspagem e alisamento radicular
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Rotações por minuto
SSC	<i>Standart Saline Citrate</i>
TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TFD	Terapia fotodinâmica
TSA	Trypticase soy agar
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro (mL)
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Célsius
≅	aproximadamente igual
>	maior
<	menor
μL	microlitro
μg/ml	micrograma por mililitro
μm	micrometro(s)
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
Log	logaritmo
μM	micromolar

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Doença Periodontal	13
1.2. Tratamento periodontal	17
1.3. Terapia Fotodinâmica	19
1.4. Biofilmes bacterianos	23
1.5. Resistência bacteriana	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Critérios de inclusão e exclusão	27
3.2. Coleta da amostra	28
3.3. Meios de cultura e cultivo	29
3.4. Crescimento bacteriano e estoque	29
3.5. Fotossensibilizadores	29
3.6. Fontes de luz	32
3.7. Terapia fotodinâmica antimicrobiana	33
3.8. Teste de susceptibilidade bacteriana em fase planctônica	33
3.9. Desenvolvimento do Biofilme e teste de susceptibilidade	36
3.10. Ciclos para avaliação da resistência	37
3.11. Checkerboard DNA-DNA Hybridization	38
3.12. Avaliação da viabilidade celular	41
3.13. Quantificação da biomassa total	42
3.14. Avaliação da relação vivo/morto através da microscopia de fluorescência confocal ..	43
3.15. Avaliação da Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme	44
3.16. Perfil de sensibilidade ao metronidazol	44
3.17. Análise estatística	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Redução bacteriana	45
4.2.1. Terapia fotodinâmica em fase planctônica com azul de metileno	45
4.2.2. Terapia fotodinâmica em fase planctônica com clorina-e6	48
4.2.3. Terapia fotodinâmica em suspensão com curcumina	51
4.3. Avaliação da viabilidade celular	55
4.4. Ciclos de indução de resistência em fase planctônica	57
4.5. Terapia fotodinâmica em fase de biofilme	60
4.5.1. Terapia fotodinâmica em biofilme com azul de metileno	61
4.5.2. Terapia fotodinâmica em biofilme com clorina-e6	63
4.5.3. Terapia fotodinâmica em biofilme com curcumina	65
4.6. Ciclos de indução de resistência em biofilme	68
4.7. Quantificação da biomassa total do biofilme.	70
4.8. Avaliação da relação vivo/morto através da microscopia de fluorescência confocal. ...	73
4.9. Avaliação da internalização dos fotossensibilizadores	77
4.10. Checkerboard DNA-DNA Hybridization	78
4.11. Teste de sensibilidade ao metronidazol	84
5. Conclusões	85
6. Referências bibliográficas	87
7. Anexos	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Periodontal

A doença periodontal é reconhecida como a segunda enfermidade bucal mais prevalente no mundo, ocorrendo tanto nos países desenvolvidos, bem como nos países em desenvolvimento e tem como causa principal o acúmulo de biofilme nas superfícies dos dentes (Lindhe et al., 1982). É um processo patológico infecto-inflamatório, podendo ser causado por micro-organismos presentes na placa bacteriana supra e subgengival, acometendo as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, geralmente ocasionando a perda progressiva de inserção do tecido ósseo, com eventual perda do elemento dentário. A destruição dos tecidos periodontais se dá pela ação dos produtos tóxicos liberados na área subgengival, e também pela resposta inflamatória desencadeada pela presença dos micro-organismos e seus subprodutos tóxicos (Loesche et al., 1985; Pennel, Keagle, 1977).

A comprovação da natureza infecciosa da doença periodontal foi evidenciada por Loe e colaboradores (1965), ao demonstrarem a relação positiva entre o acúmulo de placa bacteriana dentária e a inflamação dos tecidos periodontais, estabelecendo o conceito da "Hipótese da placa não específica", teoria que associava qualquer acúmulo de micro-organismos na margem gengival à produção de fatores irritantes, com consequente inflamação gengival e destruição periodontal (Thailade, 1986). Porém, em 1986, Loe et al observaram em um estudo, que certos indivíduos apesar da presença massiva de placa bacteriana gengival, não manifestavam a doença periodontal, contradizendo os conceitos anteriores de inespecificidade da placa dentaria. Surgia então a "Hipótese da placa específica", a qual relaciona a composição microbiana da placa dental ao aparecimento e progressão da doença. Ainda, a variação no quadro inflamatório é decorrente das diferentes respostas imunológicas de cada organismo, o que leva a um maior ou menor tempo para o surgimento dos sinais clínicos (Allenspach-Perzilka; Guggenheim, 1983; Loe et al., 1975).

As manifestações da doença periodontal inflamatória podem ser divididas em gengivite e periodontite. A gengivite é causada pelo acúmulo indiferenciado de bactérias na margem gengival, sendo um processo inflamatório reversível por meio da remoção da placa e instauração de hábitos de higiene bucal. A periodontite, por

sua vez, está associada às respostas do sistema imunológico e ao aumento nos níveis e proporções de bactérias específicas nos tecidos de sustentação dos dentes, relacionado não somente à quantidade de biofilme mas principalmente quanto à sua composição, pois algumas bactérias são capazes de alterar o ecossistema subgengival, permitindo a colonização de outros micro-organismos mais virulentos, promovendo a geração de um biofilme cada vez mais complexo (Rosenberg et al., 1981; Hinrichs et al., 1985).

Apesar de diversos estudos microbiológicos terem identificados mais de 400 espécies bacterianas presentes no interior da bolsa periodontal, os resultados apontaram apenas uma quantidade limitada dessas espécies envolvidas na doença periodontal destrutiva (Socransky; Haffajee, 1994). Dessa forma, a placa bacteriana presente em lesões de periodontite é qualitativamente distinta da placa presente em sítios saudáveis (Socransky, 1970; Listgarten et al., 1978; Loesche et al., 1985; Socransky et al., 1998; Rosenberg et al., 1981; Loe et al., 1986; American Academy of Periodontology, 1996).

O conceito da etiologia das doenças periodontais sugere que sua ocorrência e progressão são dependentes do resultado da interação de bactérias periodontopatogênicas, com diferentes virulências, presentes no biofilme dental, associadas a fatores modificadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, como demonstrado em um estudo, o qual se coletou amostras de soro e da placa bacteriana subgengival de 48 indivíduos portadores de doença periodontal crônica. Por meio do teste ELISA foi detectado o nível de anticorpos no soro para *Porphyromonas gingivalis*. A quantidade de *P. gingivalis* na placa subgengival foi estabelecida por semeadura em meio de cultura apropriado. Os resultados apontaram uma relação inversamente proporcional entre esses dois parâmetros, ou seja, altos níveis de anticorpos para *P. gingivalis* estavam associados com quantidades reduzidas desta espécie na placa subgengival, sugerindo uma reação imunológica de defesa do hospedeiro para diminuir a progressão da doença (Socransky; Haffajee, 2005). Assim, o processo saúde-doença periodontal é dinâmico e dependente da virulência das bactérias e da capacidade de defesa do organismo, com o padrão de progressão diretamente relacionado ao binômio agressão e defesa (Page et al., 1997; Moore; Moore, 2000)

A periodontite está associada também a outros fatores como: diabetes, vírus da imunodeficiência humana (HIV), estresse, predisposição genética baixas

condições socioeconômicas e comportamentos prejudiciais à saúde, tais como o tabagismo, alcoolismo, dieta insatisfatória, higiene bucal insuficiente e dificuldade de acesso a serviços de saúde (Emrich et al., 1991; Jette et al., 1993).

A identificação e quantificação dos micro-organismos envolvidos na instalação e progressão da doença periodontal é um passo importante para se implementar medidas de tratamento. Porém, até o fim da década de 1980 os métodos tradicionais de diagnóstico, tal como cultura bacteriana, foram incapazes de realizar a correta detecção e quantificação de patógenos importantes no biofilme subgengival, uma vez que esses são em grande parte anaeróbios estritos e possuem condições específicas de crescimento. Além disso, existe a dificuldade no cultivo de espécies presentes em quantidades reduzidas nas amostras de placa, fazendo com que determinadas bactérias que poderiam estar envolvidas na doença, ficassem sem a devida caracterização e conhecimento. Em vista desse cenário, as pesquisas em periodontia buscaram desenvolver métodos independentes de cultura, com o objetivo de obter maiores informações quanto a composição da microbiota. Dessa forma, com o advento de técnicas imunológicas e de biologia molecular, na década de 1990, foi possível realizar uma descrição mais acurada das espécies bacterianas subgengivais que estão relacionadas à doença periodontal, por apresentarem maior sensibilidade, especificidade e rapidez (Kazor et al., 2003; Ávila-campus et al., 1999; Socransky et al., 1994; Gomes et al., 2006; Tanner et al., 1986; Chen; slots. 1999).

Uma dessas técnicas de diagnóstico microbiológico foi descrita por Socransky et al. (1998), sendo denominada de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para diagnóstico microbiológico, e utiliza sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA) para identificação bacteriana. Esta técnica permitiu a elaboração de pesquisas que visaram o conhecimento da microbiota das doenças periodontais, promovendo a avaliação de um grande número de amostras e micro-organismos orais.

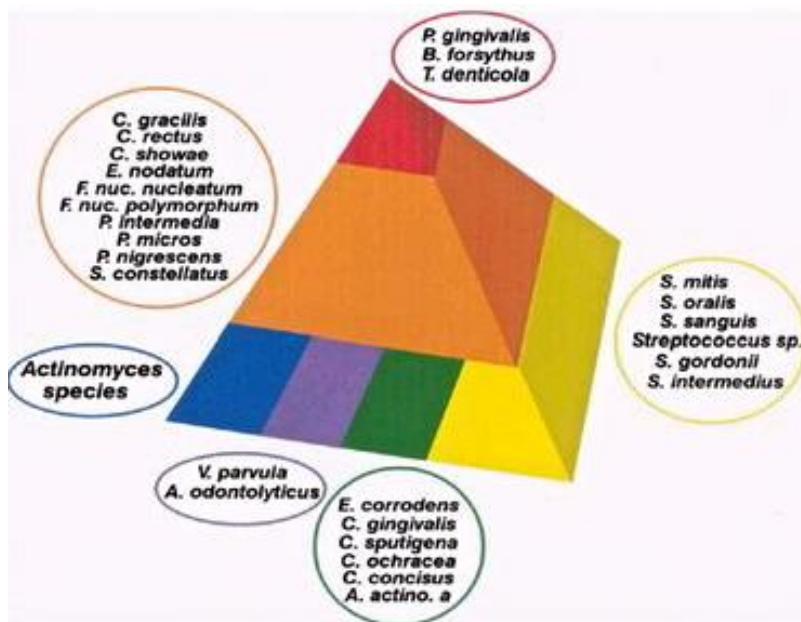
Socransky et al (1998), por meio desta técnica, analisaram associações entre 40 espécies de micro-organismos presentes no biofilme subgengival de 160 indivíduos portadores da doença periodontal, e suas relações com os parâmetros clínicos de inflamação. Os pesquisadores identificaram a existência de cinco complexos bacterianos principais (figura 1), compondo a microbiota destes biofilmes. Um desses complexos foi chamado de complexo vermelho, e é associado à presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Tenarella forsythia* e *Treponema denticola*, aceitas como agentes etiológicos da periodontite crônica e relacionadas ao sangramento gengival e

aumento de profundidade de bolsa. Outro complexo identificado foi o laranja, o qual precede a instalação do complexo vermelho e seus constituintes são considerados possíveis patógenos periodontais, este foi dividido em dois subgrupos: um central, sendo constituído por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*, e outro periférico formado por *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos intitulados de verde, amarelo e roxo, são integrados por bactérias que colonizam a superfície dentária nos estágios iniciais da formação do biofilme, e apresentaram uma grande associação entre si, além de serem compatíveis com a saúde periodontal. No entanto esses complexos basais fornecem receptores e oferecem um ecossistema propício para o surgimento das bactérias presentes no complexo laranja e por sua vez no complexo vermelho, que de fato estão envolvidas com a patogênese das doenças periodontais (Socransky et al., 2002)

As espécies presentes no complexo verde são: *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O complexo amarelo é constituído por um grupo de estreptococos: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus intermedius*. O complexo roxo abriga *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Posteriormente algumas espécies de Actinomicetos foram agrupadas no complexo azul (Socransky et al., 1994; Socransky; Haffajee, 2002).

Além da identificação de novas espécies de bactérias no biofilme subgengival, a aplicação das técnicas de biologia molecular possibilitou um melhor entendimento do papel etiológico das espécies bacterianas presentes no quadro de periodontite.

Figura 1 – Complexos bacterianos na doença periodontal.



Representação dos complexos microbianos de formação de biofilme subgengival descrito por Socransky e colaboradores, ilustrando a posição e composição microbiana de cada um dos complexos.

Fonte: Socransky, S.S.; Haffajee, A.D. Periodontology 2000, v. 28, p. 12-55, 2002.

1.2. Tratamento periodontal

A doença periodontal tem como principal causa o acúmulo de biofilme dental nas superfícies dos dentes. Este biofilme constitui uma estrutura altamente organizada, na qual espécies microbianas estão unidas umas às outras, inseridas em uma matriz polimérica extracelular, formando um sistema altamente protetor para as espécies nele residentes. A ausência de tratamento da periodontite pode ocasionar a perda de unidades dentárias, devido a destruição do osso alveolar (Costerton et al., 1999).

O tratamento não cirúrgico das doenças periodontais destrutivas, consiste na remoção ou alteração da microbiota patogênica do biofilme. A raspagem e alisamento radicular (RAR) é o tratamento periodontal mais utilizado, sendo considerado o método padrão "ouro", e é realizado por meio da remoção dos depósitos de placa bacteriana e cálculo abaixo da margem gengival por meio da instrumentação mecânica meticulosa, a fim de inibir a progressão da doença, inibindo a recolonização da superfície dental pelo biofilme (Drisko et al., 1995; Gomes et al., 2008).

Diversos estudos têm apontado os benefícios clínicos e microbiológicos provenientes desta terapia, tais como ganho no nível clínico de inserção, redução de profundidade da bolsa periodontal, e uma diminuição dos patógenos. Evidenciando que o controle da placa bacteriana subgengival é necessário para a adequada cicatrização periodontal e manutenção da saúde gengival (Cugini et al., 2000), Simonson et al. (1992) verificaram uma redução nos níveis de *Treponema denticola* e *P. gingivalis* após 12 meses de instrumentação periodontal. De forma semelhante Rawlinson et al. (1993) também constatou uma diminuição nos níveis de *Prevotella intermedia* após 12 meses de RAR, ao examinarem 30 sítios em 15 pacientes com periodontite crônica. Kamma e Baehni (2003), em seus estudos, mostraram que controles periódicos da placa bacteriana foram capazes de manter a estabilidade clínica da maioria dos sítios de inflamação, com apenas uma pequena porcentagem desses sítios sofrendo uma progressão da doença, relacionadas à presença de *P. gingivalis* e *T. denticola*.

Entretanto, embora a RAR seja efetiva, o fator limitante desta terapia é a dificuldade técnica de intervir em biofilmes de áreas de difícil acesso, como bifurcações, concavidades radiculares, grandes invaginações e bolsas periodontais profundas. Além disso, alguns patógenos periodontais, como por exemplo o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, possuem a capacidade de invasão tecidual, logo, a persistência dessas bactérias na superfície radicular pode promover uma recolonização de sítios já tratados, acarretando em uma possível recidiva (Coob, 2002; Slogastra, 2013).

Com o objetivo de otimizar os efeitos proporcionados pela RAR, outras formas de tratamentos têm sido propostas, como a associação de antibióticos locais ou sistêmicos, específicos da microbiota predominante, visando eliminar os micro-organismos persistentes após a instrumentação radicular. Os estudos clínicos e revisões sistemáticas sustentam o uso do antibiótico devido à melhora nos padrões clínicos de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento a sondagem (Purucker et al., 2001; Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003; Guerrero et al., 2005; Feres-Filho, 2007).

Algumas pesquisas relatam um efeito benéfico da associação sistêmica de determinados antimicrobianos como metronidazol, um antibiótico do grupo dos nitro-5-imidazóis, que age exclusivamente sobre a flora bacteriana anaeróbia, atuando na degradação e inibição da síntese do DNA bacteriano e é utilizado principalmente para

o tratamento da periodontite agressiva, tendo efeito na supressão de *Aggregatibacter*, *actinomycetemcomytans* e *P. gingivalis* (Guerrero et al., 2005; Baltacioglu et al., 2011).

Matarazzo et al. (2008) compararam 43 indivíduos portadores de periodontite crônica tratados isoladamente com RAR e RAR combinado à metronidazol (400mg), demonstrando uma melhora considerável (grupo RAR associado ao metronidazol) nos parâmetros clínicos e microbiológicos 3 meses após o início da terapia. Feres et al (2001) observaram que o uso de metronidazol 250 mg ou amoxicilina 500 mg por 14 dias, foi capaz de alterar a microbiota subgengival em pacientes com periodontite crônica. Porém, apesar da melhora nesses indivíduos, a utilização de antibióticos como terapia coadjuvante na doença periodontal vem sofrendo uma grave limitação em decorrência do aparecimento de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos, além de poderem acarretar extensos efeitos colaterais (erupção cutânea ou lesão da pele, mudança na flora intestinal, náusea, vômitos e dores de cabeça) e apresentarem uma dificuldade em atingir concentrações bactericidas no fluido gengival crevicular, tornando necessária a busca por tratamentos coadjuvantes alternativos (Herrera et al., 2008; Walker et al., 2004).

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem se mostrado promissora, sendo cada vez mais explorada pelo seu potencial de ação antimicrobiano, tendo destaque no campo oral e dental no controle da periodontite, em associação com diferentes procedimentos odontológicos como a RAR (Kharkwal, 2011; Meimandi et al., 2017; St. Denis et al, 2011; Dai; Huang; Hamblin, 2009; Ackroyd et al., 2001; Brown; Brown; Walker, 2004).

1.3. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica baseada na administração de um agente fotossensibilizador (FS) não-toxico ao paciente, com posterior irradiação de luz em um comprimento de onda adequado em presença de oxigênio, ocasionando a morte das células-alvo via dano oxidativo. Apresenta diversas vantagens no tratamento de infecções, tais como: não exigir adesão do paciente, início de ação imediato, efeito deletério independente do estado metabólico da célula alvo, eliminação de fatores de virulência e diminuição de efeitos adversos sistêmicos,

devido a sua aplicação restrita à área irradiada (Mroz et al., 2011; Brown; Brown; Walker, 2004; Dai; Huang; Hamblin, 2009).

O emprego da TFD na morte celular induzida foi relatado por Oscar Raab, estudante que trabalhava com o Prof. Herman Von Tappeiner em Munique - Alemanha. Tal descoberta foi feita acidentalmente em 1900, quando notaram que o protozoário *Paramecium infusoria* em solução de laranja de acridina morria após a exposição à luz. No entanto, nem a luz ou FS isoladamente tiveram qualquer efeito aparente sobre os paramécios. O laboratório de Von Tappeiner cunhou o termo “ação fotodinâmica” em trabalhos seguintes mostrando que além da luz, o oxigênio também era essencial (Peloi, 2007).

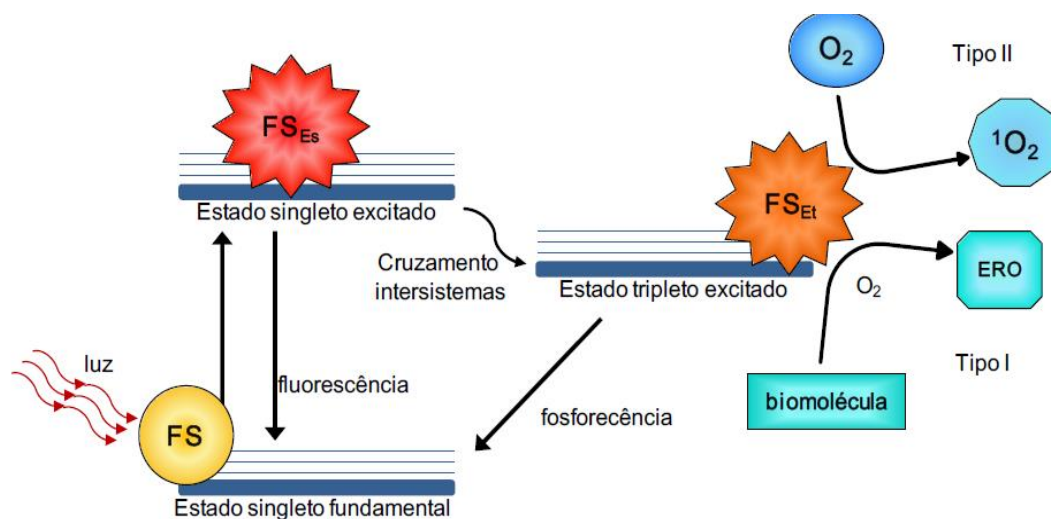
Enquanto a “ação fotodinâmica” em lesões cancerosas e/ou pré-cancerosas, juntamente com doenças não infecciosas como vitiligo, psoríase e degeneração da macula se desenvolvia, a TFD aplicada no campo das doenças infecciosas foi deixada de lado devido a descoberta dos antibióticos na década de 1940, o que na época revolucionou o tratamento das mesmas. No entanto a década de 1990 marcou o recomeço da utilização da TFD como uma terapia antimicrobiana alternativa, especialmente pelo enorme crescimento das infecções hospitalares, por conta da multiplicação de bactérias resistentes aos antibióticos (Epstein, 1990). Diversos estudos investigaram a ação da TFDa em micro-organismos da cavidade oral. Wilson et al (1992), em um de seus trabalhos avaliou o efeito da TFDa em patógenos orais após a sensibilização com azul de metileno e azul de toluidina, sob a irradiação com laser de baixa intensidade (He-Ne, 632 nm), constatando sua eficiência na eliminação de *S. sanguis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*. Nos anos 2000 estudos clínicos “*in vivo*” começaram a ser realizados para tratamento da cárie dental e biofilmes supra e subgengivais (Ackroyd et al., 2001).

Três fatores atuam concomitantemente para que a TFD ocorra: o FS, a luz e o oxigênio. Isoladamente, a luz e o FS não devem exercer efeito deletério ao substrato biológico (Lim et al., 2012). A TFD se inicia com o acúmulo e captação do FS pela célula, o que a torna sensível à luz de comprimento de onda específico ao que o FS absorve. O resultado é uma resposta fototóxica e morte devido aos danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas, incluindo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e radicais livres como radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Somente as estruturas e moléculas que estão próximas as áreas de produção das EROs são diretamente afetadas (Mroz et al., 2011; Gao et al., 2018). As EROs

apresentam um importante papel na indução do fenômeno de apoptose e necrose nas células eucarióticas. Em células procariotas as reações da TFD se dão em sítios como, parede celular, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. (Komerik et al., 2003; Girollo et al., 2009; Souza; Lage-Marques, 2010).

O mecanismo de ação da TFD pode ocorrer por meio de duas maneiras, sendo essas denominadas de reações tipo I e II (Figura 2). Na reação tipo I, o FS no estado tripleto excitado reage com um substrato biológico oxidável como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, transferindo um elétron ou H^+ para dar origem a radicais e íons radicais que então reagem com o oxigênio molecular e geram as espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Já na reação tipo II, o FS tripleto excitado transfere energia diretamente ao oxigênio em seu estado tripleto fundamental, em um fenômeno chamado aniquilação tripleto-triplete, formando oxigênio singleto, altamente reativo e citotóxico. As duas reações ocorrem ao mesmo tempo e a relação entre esses dois processos depende do FS utilizado, das concentrações de substrato e oxigênio, além da afinidade de ligação do FS com o substrato e parâmetros de iluminação (Dolmans; Fukumura; Jain, 2003; Machado, 2000; Kharwal et al., 2011; Ribeiro et al., 2011).

Figura 2 – Esquema ilustrativo sobre o mecanismo de ação tipo 1 e tipo 2 na terapia fotodinâmica.



Fonte: Freitas, 2018.

A escolha do FS é de fundamental importância na garantia da efetividade da terapia. Em um aspecto geral, o FS deve ser uma molécula biologicamente estável, capaz de absorver luz preferencialmente do espectro eletromagnético visível, não

exercendo citotoxicidade significativa ao hospedeiro na ausência da luz. Deve apresentar boa seletividade e baixa toxicidade sistêmica e que seja preferencialmente de baixo custo e fácil síntese. Diversas moléculas de FS vem sendo utilizadas em estudos envolvendo a TFD, como por exemplos derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina) e tetrapirrólicos (porfirinas e clorinas). A maioria dos FS ativam-se pela luz no comprimento de onda visível entre 400 e 700 nm, o que corresponde a uma profundidade de penetração de luz de aproximadamente 0,5 a 1,5 cm. Quando há uma maior necessidade de penetração, é preciso utilizar FS que absorvam bem o infravermelho, como por exemplo, a indocianina verde, que absorve em 810 nm (Abrahamse, Hamblin, 2016).

Apesar da concentração do FS desempenhar um papel importante na eficácia da TFD antimicrobiana, os parâmetros de luz como dose total de energia devem ser detalhadamente estudados. Em geral, a foto-inativação de células microbianas é dependente da dose de luz entregue na amostra, somados a presença do FS. (Ackroyd et al., 2001, Arakane et al., 1996).

Como já é sabido, a luz é um dos três componentes imprescindíveis para que ocorra a TFD, por isso a escolha correta da fonte de luz é essencial para a eficácia da terapia. As fontes de luz que podem ser utilizadas para o emprego da TFD, de acordo com a literatura, incluem os LEDs (*light-emitting diode*), lasers e as lâmpadas halógenas de amplo espectro. Com os LEDs apresentando a melhor relação custo-benefício, além de poderem ser dispostos em matrizes, apresentando diversos formatos, facilitando sua aplicação em áreas maiores do que seria possível utilizando-se o laser (Ribeiro; Sabino, 2016; Chen et al., 2012).

A efetividade da ação antimicrobiana da TFD também é influenciada pela diferente fisiologia entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma vez que a parede das bactérias Gram-positivas favorece o transporte das moléculas neutras e aniônicas dos FS. Por outro lado, o peptídeoglicano e a membrana externa e periplasmática presentes na constituição das bactérias Gram-negativas, contém numerosas moléculas carregadas negativamente, tais como o LPS (lipopolissacarídeo) e funcionam como uma barreira física e funcional à ligação e a transposição das moléculas do FS, do meio externo para o citoplasma (Friedrich et al., 2000). Os FS catiônicos apresentam uma rápida associação às células microbianas, tendo boa afinidade pelas bactérias Gram-negativas, favorecendo a

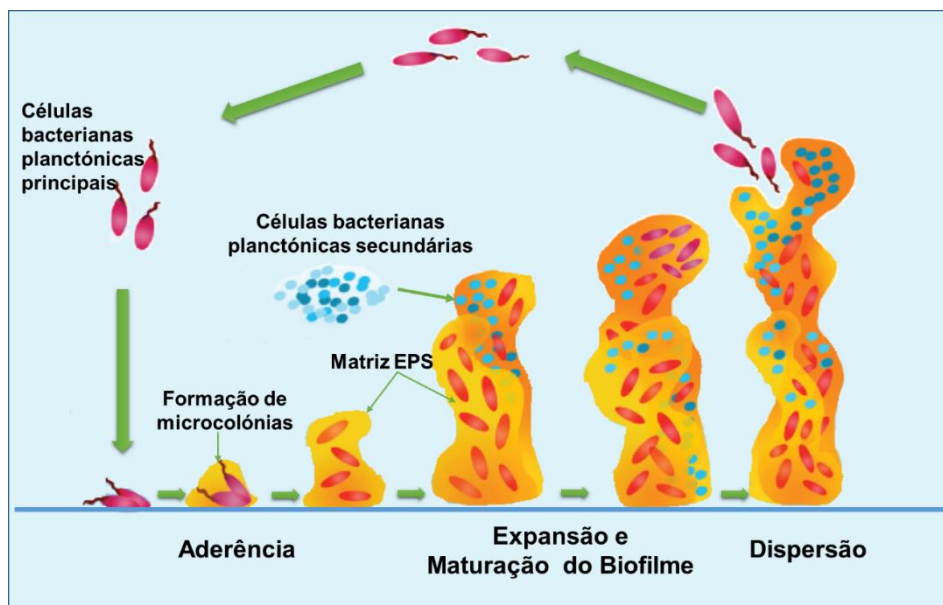
relação de seletividade e preservando a integridade das células hospedeiras (Malik et al., 1992; Nitzan et al., 1992).

1.4. Biofilmes bacterianos

Uma das preocupações atuais no campo das infecções bacterianas são os biofilmes. Um biofilme microbiano é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas, envolvidas em uma matriz polimérica autoproduzida, aderidas a superfícies inertes ou vivas, que se comunicam entre si por meio de um mecanismo denominado *quorum sensing*. A matriz contém polissacarídeos, proteínas e DNA microbiano extracelular, com a função de proteger o biofilme do sistema imune do hospedeiro, impedindo o reconhecimento dos micro-organismos pelos fagócitos e inibindo a ativação do sistema complemento. Através do *quorum sense*, os micro-organismos podem interferir na estrutura do biofilme, de modo a estimular o crescimento de espécies benéficas e inibir o crescimento de outras espécies competitivas. As propriedades fisiológicas das células bacterianas também podem ser modificadas, por meio deste mecanismo de comunicação, favorecendo a expressão de genes para a resistência a antibióticos, de modo a proporcionar a proteção de toda a comunidade (Rumjanek; Fonseca; Xavier, 2004; Socransky, Haffajee, 2000; Domenech, 2013; Taraszkiewicz, 2013).

A formação do biofilme tem início com o processo de adesão dos micro-organismos a superfícies bióticas e abióticas e pode ser dividida em dois estágios: a fixação reversível inespecífica primária e a adesão irreversível específica. A aderência inicial a superfícies abióticas é geralmente inespecífica, enquanto a adesão em tecidos vivos envolve interações específicas baseadas em lectina ou baseadas em adesinas, sendo facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, formando micro-colônias e canais de água adjacentes, sendo úteis na obtenção de nutrientes e na excreção de produtos tóxicos (Kyaw, 2016; Arciola et al., 2005). Tal adesão bacteriana e sua consequente formação de biofilme (Figura 3), possui um importante papel na patogênese, representando um grande desafio no combate a infecções persistentes e garantia da saúde humana (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999).

Figura 3 – Estágios de formação do biofilme.



Fonte: Tremblay et al. 2014.

Esquema da formação do biofilme mostrando inicialmente a adesão de células bacterianas em fase planctônica no substrato, com subsequente proliferação, dando origem ao biofilme. As células passam pelo período de maturação e expansão do biofilme, com posterior dispersão de células planctônicas, para colonização de novos sítios.

Um grande número de infecções crônicas envolve o biofilme, tornando-as muito mais difíceis de serem erradicadas pela terapia convencional antimicrobiana. Estima-se que a resistência do biofilme aos antimicrobianos seja na ordem de 1000 a 1500 vezes superior, em relação as bactérias na forma planctônica (Socransky, Haffajee, 2000; Stewart; Costerton, 2001; Taraszkievicz, 2013).

Diante disso, foram propostos alguns mecanismos de resistência do biofilme ao antibiótico. O primeiro mecanismo propôs alterações na barreira físico-química que a matriz representa para o antibiótico. Høiby, Ciofu e Bjarnsholt (2010) demonstraram que a resistência do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* frente ao tratamento antimicrobiano está relacionada com a presença de muco produzido pelo biofilme, a qual representa uma barreira física, reduzindo a internalização do fármaco em suas camadas mais basais. Jefferson, Goldmann e Pier (2005) sugeriram que, embora a matriz não possa inibir a penetração do antibiótico, ela pode retardar a taxa de penetração o suficiente para, provavelmente, induzir a expressão de genes que levam a geração da resistência. Além disso, existem estudos que demonstraram que

bombas de efluxo são altamente ativas em biofilmes bacterianos, fazendo com que os fármacos sejam expulsos do interior deste (Kishen, 2010).

A segunda hipótese para explicar a reduzida sensibilidade de biofilmes aos fármacos refere-se ao estado metabólico dos micro-organismos. Zonas com nutrientes esgotados e redução de oxigênio dentro do biofilme, resultam em uma fase estacionária do tipo dormência, influenciando na resistência e persistência dos biofilmes frente aos agentes dependentes de processos biológicos ativos (Brown, Allison, Gilbert, 1988).

Já a terceira hipótese envolve a adaptação genética para diferentes condições. A frequência de mutação de um microrganismo no biofilme em crescimento é significativamente mais elevada do que a da sua forma planctônica (Driffield, 2008). Além disso, a grande densidade celular em biofilmes facilita altas taxas de transferência gênica horizontal entre os micro-organismos, e a conjugação ocorre mais frequentemente entre membros de comunidades de biofilmes do que entre bactérias na fase planctônica (Sorensen et al., 2005).

1.5. Resistência bacteriana

A principal forma de tratamento para infecções é a quimioterapia antimicrobiana, no entanto, como dito anteriormente esta é uma modalidade que sofre limitações devido à resistência aos fármacos. Esta resistência pode ser dividida em duas categorias: a resistência intrínseca, que diz respeito a habilidade inerente da bactéria em impedir a ação de determinado fármaco através da inativação de uma molécula, influxo diminuído e/ou efluxo aumentado ou pela baixa afinidade do alvo terapêutico pelo fármaco. A resistência extrínseca, que está relacionada a respostas adaptativas da bactéria frente a exposição de determinado tratamento, fazendo com que ocorra o desenvolvimento de tal resistência, por meio de mutações, aquisições de genes exógenos ou ativação de vias compensatórias (Cox; Wright, 2013; Ammor et al., 2008).

Atualmente infecções resistentes a antibióticos afetam mais de 2 milhões de pessoas todos os anos e matam pelo menos 23 mil somente no Estados Unidos e na União Europeia (World Health Organization, 2014). A Organização Mundial da Saúde não tem como providenciar estatísticas globais, pois muitos países não divulgam estimativas, mas tem alertado que a "era pós-antibióticos", onde infecções comuns

podem voltar a matar com frequência muito aumentada, é uma realidade cada vez mais concreta. A infecção provocada por cepas resistentes reduz drasticamente a probabilidade de sucesso terapêutico, e os gastos de saúde associados podem chegar a casa dos bilhões por ano (Fair; Tor, 2014; World Health Organization, 2014). Embora a resistência bacteriana continue a surgir, desde a década de 1980 não há o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos (Cassir; Rolain; Brouqui, 2014).

Pelo fato de a TFDa atuar em múltiplos alvos, conferindo um caráter não específico de inativação celular, o desenvolvimento de resistência bacteriana é tido como improvável. Fatores como a alta reatividade e o curto período de meia-vida do $^1\text{O}_2$ e das EROS, dificultam a expressão de mecanismos de proteção, tendo nessa característica sua principal vantagem em relação à antibioticoterapia (Akilov et al., 2006; Dolmans, Fukumura, Jain, 2003).

No entanto, estudos sobre o potencial dos micro-organismos em desenvolver resistência à TFDa são escassos e controversos (St Denis et al., 2011; Akilov et al., 2006).

É possível que mecanismos de resistência intrínseca impeçam ou diminuam a entrada do FS, o que poderia minimizar a eficácia da terapia, tendo em vista que a entrada e o acúmulo de FS na célula-alvo é necessário para que o processo fotodinâmico seja bem-sucedido. Outro fator que poderia influenciar na tolerância microbiana contra a TFDa, são os sistemas de proteção enzimáticos contra o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, os quais são removidos por superóxidos dismutases e por catalases/peroxidases, respectivamente. As bactérias respondem a níveis aumentados de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 pela indução transcricional de genes codificadores de proteínas protetoras, juntamente com sistemas protetores adicionais, como as proteínas de choque térmico, responsáveis pelo redobramento, reparo, reciclagem de proteínas danificadas e estabilização de membranas lipídicas durante o estresse celular (Casas et al., 2011; Al-mutairi et al., 2018; Horvát et al., 2008).

Neste estudo investigamos *in vitro* a susceptibilidade das bactérias da placa bacteriana, derivada de pacientes portadores da doença periodontal, em fase planctônica e biofilme, frente ao tratamento com TFDa, após a sensibilização com determinadas concentrações de azul de metileno, clorina-e6 e curcumina. Buscamos também comprovar a possibilidade de desenvolvimento de resistência dessas bactérias periodontopatogênicas após sucessivas aplicações de TFDa sob uma condição sub ótima.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial de redução e desenvolvimento de resistência bacteriana periodontopatogênica, via múltiplos ciclos de TFDa, em fase planctônica e biofilme.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar:
Concentração não tóxica no escuro de cada FS;
Dose de luz ideal para cada um dos diferentes FS empregados;
Concentração Inibitória Mínima (CIM) da TFDa, em suspensão e biofilme.
- Avaliar se ocorreu o surgimento de resistência bacteriana em fase planctônica e biofilme, após aplicações sub-ótimas sucessivas de TFDa;
- Investigar a atividade metabólica bacteriana;
- Quantificar a biomassa total do biofilme após a aplicação da TFDa;
- Avaliar a internalização dos FS nas amostras de biofilme;
- Identificar e quantificar as espécies bacterianas presentes na amostra, antes e após aplicação dos ciclos sub-ótimos de TFDa;
- Verificar o perfil de sensibilidade bacteriana ao tratamento com metronidazol

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Critérios de inclusão e exclusão

A coleta do material biológico foi aprovada pelo comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara – UNESP, (anexo A) sendo realizada em uma clínica odontológica particular, localizada na cidade de Araraquara-SP, em pacientes portadores da doença periodontal, seguindo todas as diretrizes impostas pelo comitê de ética desta universidade, sob todas as recomendações de biossegurança e por profissionais capacitados, que realizaram o exame clínico e a anamnese.

A adesão do paciente à pesquisa (n=3) foi espontânea, não se promovendo obrigatoriedade ou constrangimento ao indivíduo. Todos os pacientes assinaram o

termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B) estando de acordo com a resolução nº196/96 versão 2012 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

Os requisitos básicos para a inclusão no estudo foram: apresentar boas condições de saúde geral, sem quaisquer alterações sistêmicas evidentes ao exame clínico, ou detectado pela anamnese. O paciente deveria ser portador de doença periodontal, não ser usuário de tabaco e apresentar ao menos 10 sítios com mais de 5 mm de profundidade à sondagem nos molares e pré-molares.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: não apresentar história positiva de uso de antibióticos ou qualquer tipo de tratamento periodontal no período de ao menos 3 meses que antecederam este estudo, estar imunossuprimido, imunodeprimido e ser portador de cardiopatias.

3.2. Coleta da amostra

A obtenção da placa bacteriana, da bolsa periodontal de cada paciente, foi realizada com a utilização de curetas de Gracey, nos pré-molares e molares com sangramento à sondagem e profundidade de bolsa superior a 5 mm. Todo o material biológico coletado foi armazenado em um tubo estéril de micro centrífuga (formando um *pool* bacteriano homogêneo), contendo solução salina estéril e transportado imediatamente para o laboratório, sendo centrifugado a 100 rotações por minuto (xg). O pellet de células resultante foi ressuspensionado e aliquoteado em tubos contendo 100 µL de caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion – BHI – Kasvi, Pinhais, PR, Brasil) com 10% de glicerol.

Posteriormente as amostras foram congeladas em ultrafreezer sob a temperatura de -80°C. Uma parte da amostra coletada foi inoculada em tubos contendo 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) em pH 7,6, aos quais foram adicionados 100 µL de NaOH a 0,5 M, possibilitando que o DNA das bactérias permanecesse viável por longos períodos de tempo, para posterior quantificação das espécies dos micro-organismos presentes na amostra, por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

3.3. Meios de cultura e cultivo

O meio ágar sangue foi preparado utilizando 20 g/L de trypticase soy agar (TSA - Oxoid LTD - Basingstoke, Hampshire, England), 26 g/L de ágar BHI (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil), 10 g/L extrato de levedura (BBL), sendo autoclavado (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda. - Araraquara, SP, Brasil) a 121°C e resfriado em banho com temperatura constante de 50°C. Após o meio resfriar até 50°C, foi adicionado assepticamente 5% de sangue (volume/volume) de carneiro desfibrinado (Laborclin - Pinhais, PR, Brasil) e posteriormente suplementado com 0,3 µg/mL de hemina e 5 µg/mL de menadiona. (Sigma Chemical Co - St. Louis, MO, EUA). Este ágar foi usado para preparar as placas de cultura convencionais de 90 X 15 mm (Pleion - Barueri, SP, Brasil) e para preencher os poços das placas de 96 poços, utilizadas nos experimentos envolvendo biofilme (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil) com 150 µL de meio por poço. Após a gelificação do ágar, as placas foram devidamente embaladas e mantidas a uma refrigeração de 4°C por no máximo 5 dias (Fontana et al., 2009).

3.4. Crescimento bacteriano e estoque

O *pool* bacteriano foi cultivado em ágar sangue de carneiro (descrito no item 3.3), a uma temperatura de 37°C, em câmara de anaerobiose (80% N₂-10%CO₂-10%H₂) por 96 horas. A partir deste crescimento um estoque bacteriano foi preparado. Para tanto as colônias da placa foram raspadas com o auxílio de uma alça de inoculação (Labor plast – Cassinetta di Lugagnano, Itália) e depositadas em tubos de micro-centrifuga, contendo caldo BHI e glicerol na proporção 1:1. Os tubos de estoque bacteriano foram armazenados em ultrafreezer na temperatura de -80°C, sendo reativadas de acordo com as necessidades experimentais.

3.5. Fotossensibilizadores

Os FS utilizados neste estudo foram: azul de metileno, curcumina e clorina-e6 (Figura 4).

O azul de metileno é um derivado fenotiazínico catiônico, que possui eficácia em inativar espécies bacterianas via TFDa, tanto *in vitro* como *in vivo* e seu uso

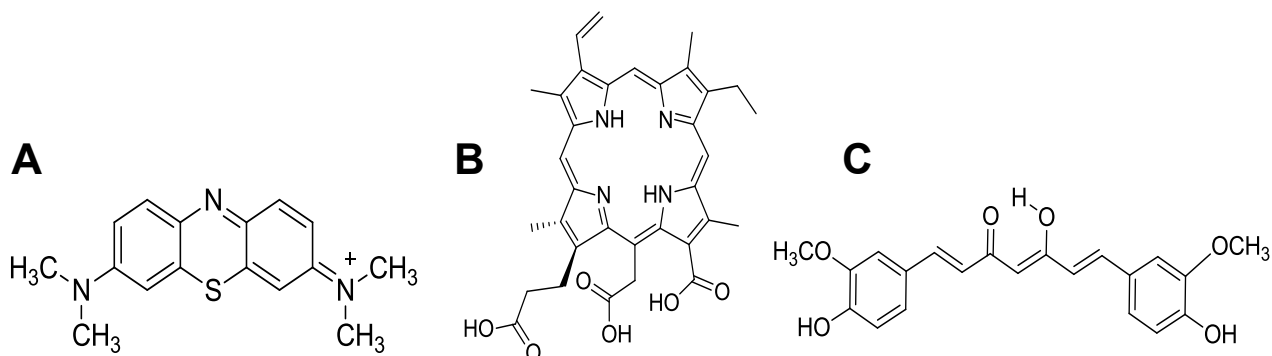
apresenta muitas vantagens, tais como elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, alta solubilidade em água e baixa toxicidade no escuro (Moftah, Ibrain, Wahba., 2016; Tardivo, 2005; Fontana et al., 2009; Nemezio et al., 2017). Esse FS foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) e ativado por luz LED em 660 nm (Figura 5A).

A clorina-e6 é um membro da família das clorinas, uma classe de substâncias tetrapirrólicas, resultantes das porfirinas (porfirinas com um anel pirrólico reduzido), absorvendo luz tanto em 400 nm quanto em 660 nm (Figura 5B) (Huang et al., 2011). E assim como o azul de metileno, foi ativada por luz em 660 nm. A amostra utilizada foi sintetizada e fornecida pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, (Departamento de Química) da UFSCar, sintetizados conforme descrito por Uliana (Uliana et al., 2014).

A curcumina é o maior constituinte do pó turmerico, pode ser obtida através da extração dos rizomas da planta *Curcuma longa* ou sintetizada quimicamente. É um composto fenólico de coloração amarelo-alaranjado e apresenta inúmeros efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes, sendo empregada na descontaminação oral. Vem sendo amplamente utilizada na TFDa como um agente fotossensibilizador, absorvendo luz nos comprimentos de onda entre 300-500 nm (Figura 5C), e foi ativada por luz em 450 nm (Epstein; Sanderson, Macdonald, 2010; Cieplik et al., 2015). Também foi fornecida pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, e sintetizada de acordo com Wichitnithad (Wichitnithad et al., 2011).

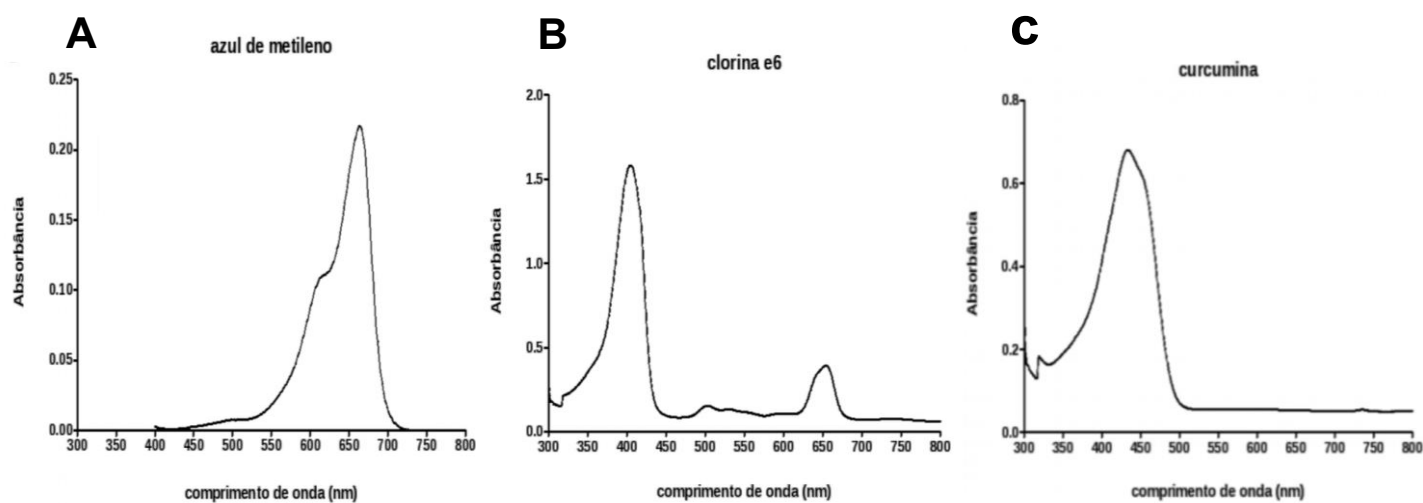
Todas as concentrações de FS empregadas nos ensaios foram derivadas por meio da diluição das soluções de trabalho e de acordo com suas solubilidades individuais (Tabela 1).

Figura 4– Estrutura química dos fotossensibilizadores



Estruturas moleculares dos fotossensibilizadores utilizados neste estudo: (A) azul de metileno; (B) clorina-e6; (C) curcumina.

Figura 5– Espectros de absorção UV-Visível dos fotossensibilizadores



Espectros de absorção UV-Visível em solução aquosa dos FS utilizados. Obtidos com equipamento multiusuário *Lambda 1050 UV/Vis/NiR spectrophotometer* (PerkinElmer, EUA) do instituto de química – UNESP Araraquara: (A) azul de metileno; (B) clorina-e6; (C) curcumina

Tabela 1 - Soluções estoque e de trabalho dos fotossensibilizadores utilizadas

Fotossensibilizador	Solução-estoque	Solução de trabalho
Azul de metileno	10 mg/mL em água deionizada	200 µg/mL em caldo BHI
clorina-e6	2 mg/mL em DMSO/água deionizada (10%/90%)	200 µg/mL em caldo BHI
curcumina	185 mg/mL em DMSO (1%)	200 µg/mL em sacarose 0,5%

3.6. Fontes de luz

As fontes de luz empregadas (Figura 6 e 7) consistem em um sistema de 48 LEDs (*light-emitting diode*) dispostos em conjunto, com comprimento de onda de emissão adequado a cada FS de intensidades variadas que podem ser selecionadas no equipamento (mW/cm^2). Fabricadas pela empresa BioPDI (São Carlos, SP, Brasil) que geram um feixe que permite uma irradiação pontual e uniformemente circular, de forma a cobrir toda a extensão da placa a ser irradiada. Possuem também um sistema de resfriamento que evita o superaquecimento do sistema.

Figura 6– Sistema de iluminação LED – 660 nm

Imagem representativa da fonte de luz de 660 nm.

Fonte: Maria Lucia Frade, 2018

Figura 7– Sistema de iluminação LED – 450 nm



Imagem representativa da fonte de luz de 450 nm

Fonte: Sarah de Annunzio, 2017

3.7. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Os experimentos foram realizados em fase planctônica e em biofilme. Para as duas fontes de luz utilizadas (450 nm e 660 nm) a luz foi irradiada de forma a cobrir toda a extensão dos poços das placas de 96 poços. De acordo com a potência de cada LED, com as dimensões do campo de irradiação e com o tempo de exposição da luz, foi então definida a fluência (densidades de energia) empregada. A fim de evitar qualquer tipo de interferência durante a irradiação, cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento.

3.8. Teste de susceptibilidade bacteriana em fase planctônica

O *pool* bacteriano coletado foi cultivado de acordo com o item 3.4 e após 96 horas de crescimento, as colônias foram raspadas da placa e suspensas em caldo BHI em quantidade suficiente para formar uma suspensão com valores de absorvância entre 0,08 a 0,1 ($\cong 1 \times 10^8$ cél/mL) em 630 nm (D.O._{630nm}) com a utilização de espectrofotômetro (Biotek - Winooski, VT, USA). Alíquotas de 50 μ L da suspensão com D.O. 0,08 - 0,1 foram transferidas para cada um dos poços da placa de 96 poços contendo as soluções preparadas de FS (com o dobro da concentração de trabalho desejada), resultando em um volume final de 100 μ L por poço e na diluição das soluções de FS e do inóculo em 50% (inóculo inicial de tratamento $\cong 5 \times 10^7$ cél/mL). As bactérias foram incubadas no escuro, em contato com cada um dos FS, por 5 minutos e então irradiadas pelo tempo e comprimento de onda adequados, para atingir a densidade de energia desejada (J/cm^2). Terminado os tempos de incubação e irradiação, foi realizada uma diluição seriada das suspensões bacterianas de cada

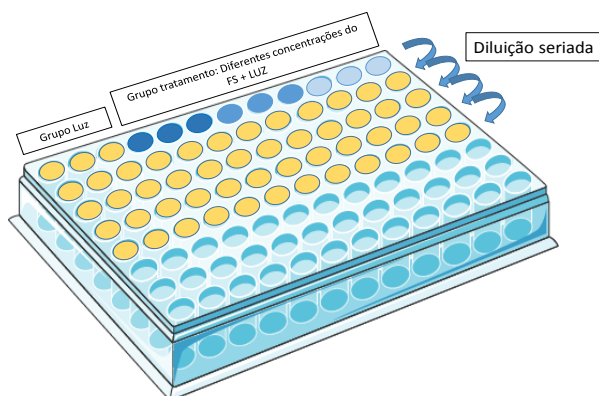
poço na base 10 até a concentração de $\cong 10^1$ cél/mL. Um volume de 5 μ L de cada suspensão a $\cong 10^1$ cél/mL foi semeado em placas de ágar sangue de carneiro e incubada em câmara de anaerobiose por 96 horas. As colônias bacterianas formadas foram contadas para determinação da densidade de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro (mL). Esta técnica (Figura 8) foi padronizada pelo grupo de pesquisa do laboratório de microbiologia clínica, comparando-se o protocolo tradicional de macrodiluição em tubos para contagem de UFC/mL e a análise estatística dos resultados revelou que não houve diferença entre as duas metodologias.

Para calcular o número de UFC/ mL foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\frac{N^{\circ} \text{ colônias} \times 10^n}{v}$$

Onde: N corresponde ao fator de diluição e v é o volume da amostra diluída que foi plaqueada em mL.

Figura 8- Representação da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana a TFDa.



Fonte: <https://smart.servier.com> modificado.

Determinou-se a condição sub ótima da TFDa nas amostras através do método de microdiluição descrito acima.

Cada grupo experimental (descritos a seguir) foi trabalhado em triplicata dentro de um mesmo ensaio, e cada ensaio foi realizado em triplicata.

Grupo controle de crescimento: Neste grupo não se aplicou nenhum tratamento. Alíquotas de 50 μ L da suspensão bacteriana foram transferidas para três poços de uma placa (titulação) de 96 poços. A seguir o mesmo volume de BHI estéril foi transferido para os mesmos poços e as amostras permanece em repouso ao abrigo

da luz durante o tempo de incubação somado ao tempo de tratamento das amostras submetidas a TFDa. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como parâmetro de comparação com aqueles obtidos com os grupos de tratamento.

Grupo fotossensibilizador: Para avaliar a toxicidade do azul de metileno, clorina-6 e curcumina sobre as amostras, alíquotas de 50 µL do *pool* bacteriano foram transferidas em três poços de uma placa de 96 poços. Em seguida adicionou-se 50 µL de azul de metileno, clorina-e6 e curcumina nas concentrações desejadas, mantendo a placa ao abrigo da luz pelo tempo correspondente ao período de incubação mais o tempo de tratamento.

Grupo luz: Esse grupo teve por finalidade avaliar se aplicação da luz (LED) na ausência do FS, produziria efeitos tóxicos para o *pool* bacteriano. Desta forma, alíquotas de 50 µL da suspensão bacteriana foram transferidas para os poços da microplaca de diluição, adicionando-se em seguida, 50 µL de meio de cultura BHI. As amostras foram mantidas no escuro durante o tempo de incubação e após esse tempo foi realizada a irradiação com as doses de luz desejadas.

Grupo TFDa: Para avaliar a ação da TFDa, 50 µL da suspensão bacteriana, foram inoculadas em três poços. Em seguida foram acrescentadas alíquotas de 50 µL do FS a ser avaliado. Após o tempo de incubação, a irradiação da placa foi efetuada (todas as irradiações foram feitas de forma fracionada, devido a uma limitação do equipamento que necessitava de uma pausa para não sobreaquecer o sistema, sendo 60 segundos de irradiação direta e 60 segundos de pausa, até completar o tempo total de tratamento).

Os parâmetros utilizados nos grupos experimentais se encontram descritos na tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros experimentais do estudo em fase planctônica

Grupo experimental	Concentração de FS	Dose de luz
Controle de crescimento	0	0
Luz	0	25, 30, 60, 100, 120 J/cm ²
Grupo FS – azul de metileno	6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 µg/mL	0
Grupo FS – clorina-e6	12,5; 25; 50; 100 µg/mL	0
Grupo FS - curcumina	12,5; 25; 50; 100 µg/mL	0
TFDa – azul de metileno	6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 µg/mL	60; 100; 120 J/cm ²
TFDa – clorina-e6	12,5; 25; 50; 100 µg/mL	25 e 30 J/cm ²
TFDa – curcumina	12,5; 25; 50; 100 µg/mL	25 e 30 J/cm ²

3.9. Desenvolvimento do Biofilme e teste de susceptibilidade

Para a realização do desenvolvimento do modelo de biofilme, técnica *in vitro* (Fontana et al., 2009), foram necessárias placas com 96 poços, previamente preparadas com uma base de 150 µL ágar sangue suplementado com hemina e menadiona em cada poço, conforme descrito no item 3.3. Para iniciar o crescimento do biofilme foi utilizado 150 µL da suspensão bacteriana preparada em caldo BHI e ajustada com valor de absorbância entre 0,08 a 0,1 ($\cong 1 \times 10^8$ cél/mL) em 630 nm (DO_{630nm}). Preencheu-se cuidadosamente cada poço da placa e posteriormente foi realizada a incubação em atmosfera anaeróbia a 37°C por sete dias. Nas primeiras 48 horas de incubação não houve nenhuma troca de meio de cultura. Somente a partir do terceiro dia, o meio antigo foi aspirado e renovado diariamente com 150 µL de caldo de BHI para cada poço até o sétimo dia de cultivo, quando o biofilme atinge seu estágio maduro para então realizar o tratamento.

Após a maturação do biofilme, foi removido 150 µL de BHI e adicionado 50 µL das concentrações de FS, e após o tempo de incubação de 10 minutos (para cada FS), as placas foram irradiadas. Após a TFDa, cada poço contendo as amostras foi raspado com uma alça de inoculação de 1 µL (Copan Diagnostics Inc.- Murrieta, CA, EUA) para desprender o biofilme aderido ao fundo da placa e então transferido para um micro-tubo o qual foi feita a diluição seriada. Posteriormente uma alíquota de 5 µL de cada suspensão a $\cong 10^1$ cél/mL foi semeada em placa contendo ágar sangue de carneiro suplementado. Após a semeadura, tais placas foram incubadas em câmara

de anaerobiose a 37°C. As colônias bacterianas formadas foram contadas para avaliação de UFC/mL após 96 horas de crescimento.

Os grupos analisados em biofilme foram os mesmos grupos descritos no item 3.8. E os parâmetros de concentração de FS e doses de luz estão expostos na tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros experimentais do estudo em fase de biofilme

Grupo experimental	Concentração de FS	Dose de luz
Controle de crescimento	0	0
Luz	0	100; 120; 150 J/cm ²
Grupo FS – azul de metileno	50; 75; 100; 150 µg/mL	0
Grupo FS – clorina-e6	50; 75; 100; 150 µg/mL	0
Grupo FS - curcumina	50; 75; 100; 150 µg/mL	0
TFDa – azul de metileno	50; 75; 100; 150 µg/mL	150 J/cm ²
TFDa – clorina-e6	50; 75; 100 µg/mL	100; 120; 150 J/cm ²
TFDa – curcumina	50; 75; 100 µg/mL	100; 120; 150 J/cm ²

3.10. Ciclos para avaliação da resistência

Com a finalidade de investigar a possibilidade do desenvolvimento de resistência das bactérias frente à TFDa, buscamos encontrar condições sub ótimas de redução bacteriana, situadas entre diminuições de UFC/mL maior que 1 e menor que 3 log₁₀, mimetizando uma condição de tratamento ineficaz. Segundo Moody (1992), um fármaco ou terapia apresenta atividade bactericida a partir de uma redução de UFC/mL de 3 log₁₀, e potencial bacteriostático quando a redução em UFC/mL é abaixo de 3 log₁₀.

Ao encontrar as condições sub ótimas de cada FS e dose de luz, o *pool* de bactérias foi submetido a múltiplas exposições de TFDa, com posterior período de recuperação de 96 horas em atmosfera anaeróbia; sendo que as células bacterianas sobreviventes foram submetidas novamente ao mesmo tratamento, e assim sucessivamente até que se observasse ou não o desenvolvimento de resistência ou até o limite de 15 ciclos. Essa etapa foi desenvolvida em fase planctônica e biofilme.

Aliquotas das amostras foram congeladas em tubos de micro centrifuga e armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C a cada ciclo de TFDa.

3.11. Checkerboard DNA-DNA Hybridization

A fim de investigar a proporção das espécies presentes no material biológico (em fase planctônica e biofilme), antes e após a aplicação do ultimo ciclo de exposição à TFDa nas condições sub ótimas, as amostras foram submetidas a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para 40 cepas bacterianas associadas a doença periodontal. (Tabela 4). Esta etapa foi realizada com a colaboração da Prof Dr. Magda Feres, da Universidade de Guarulhos.

O *pool* bacteriano foi cultivado conforme descrito no item 3.4. As amostras tratadas com TFDa e sem tratamento tiveram suas colônias raspadas com o auxílio de uma alça de inoculação, e depositadas em tubos de micro-centrífuga contendo 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) ao qual foram adicionados 100 µL de NaOH a 0,5 M. As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão bacteriana (biofilme e planctônico) contendo DNA livre, foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunetics, Cambridge, MA, USA) ficando concentrada em uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de micro-organismos investigadas pelas sondas, nas concentrações de 10^5 e 10^6 células. A membrana foi então removida do *minislot* e o DNA nela encontrado foi fixado por meio de aquecimento em forno 120°C por 20 minutos.

Posteriormente esta membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 X *standart saline citrate*- SSC (1 X SSC = 150 µM de NaCl, 15 mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Boehringer Mannheim). Em seguida, foi posicionada no *Miniblotter*, com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta foi adicionada uma sonda de DNA em 130 µL de uma solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 X SSC, 20 µM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

Após o período de hibridização, a membrana foi removida e lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS (dodecilsulfato

de sódio), 1 μ M de EDTA e 20 Mm de Na_2HPO_4 , a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0. Após isso a membrana foi lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, 50 μ M de MgCl_2 , pH 9,5.

Os passos seguintes foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fofatase alcalina, CDP-Star Detection Reagent (Armeshan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England, UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, chassi Radiografic 30x40cm (Konex, Ind.Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico da marca Kodak X-Omat K, 18X24 cm (Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas a uma temperatura de 20°C.

Tabela 4– Relação das sondas bacterianas empregadas. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998)

Complexo	Espécie	Cepas
Azul	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a
	<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a
	<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a
	<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a
Roxo	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a
	<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a
Amarelo	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a
	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a
	<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a
	<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a
Verde	<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a
	<i>Actinomycetemcomitans a + b</i>	29523 ^a
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a
	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a
	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a
	<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a
Laranja	<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a
	<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a
	<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a
	<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum</i>	25586 ^a
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum</i>	10953 ^a
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. vicentii</i>	49256 ^a
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
	<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
Vermelho	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
Outras Espécies	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
	<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 ^a
		11828 ^a
	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a AATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute

A leituras dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Dessa forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 quando equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a aproximadamente 10^5 células; 3 entre 10^5 e 10^6 células; 4 aproximadamente 10^6 células e 5, mais de 10^6 (Tabela 5). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies presentes nas amostras.

Tabela 5 – Índice utilizado para determinação dos níveis dos micro-organismos nas amostras

Índice	Nível do microrganismo	Contagem
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

3.12. Avaliação da viabilidade celular

O metabolismo celular das amostras foi avaliado, em fase planctônica, em triplicata e em três ocasiões independentes. O método colorimétrico de ensaio de redução da resazurina [7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido] (Sigma Chemical Co. St Louis, MD, USA) é considerado o indicador mais utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana. (Fukushima et al., 2003).

O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina, por meio de reações enzimáticas ou químicas das células viáveis (cor rósea) (Figura 9).

com água ultra-pura cada poço da placa e, em seguida, foi adicionado ácido acético 33% para remoção do corante. Uma alíquota de 100 µL desse produto resultante foi transferida para o orifício de uma placa de leitura e o resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro em 570 nm.

Os grupos analisados nesta metodologia foram os mesmos mencionados no item 3.8.

3.14. Avaliação da relação vivo/morto através da microscopia de fluorescência confocal

O Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara, FOAr – UNESP foi utilizado para a realização deste estudo. O sistema possui um Software para análise de imagens (Software ZEN BLUE 2.3 System). O biofilme foi formado de acordo com o item 3.9, em placas de 24 poços (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil), sobre uma base de ágar sangue de carneiro suplementado com hemina e menadiona. Para avaliar a relação vivo/morto, primeiramente o meio BHI foi removido do biofilme e as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS. Após a lavagem cada amostra foi marcada com 100 µL dos reagentes do kit Live/Dead Cell (SYTO-9 e iodeto de propídio), de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma Chemical Co. St Louis, MD, USA), os quais fornecem duas marcações diferentes (verde para vivas e vermelho para mortas) de ácido nucleico, distinguindo as bactérias vivas (com as membranas plasmáticas intactas) das bactérias mortas (com as membranas comprometidas) e incubados por meia hora em atmosfera livre de oxigênio. Passado o tempo de incubação, os reagentes foram retirados de cada poço e os biofilmes lavados duas vezes com PBS. Posteriormente as amostras foram examinadas na objetiva de 10X e as faixas de lasers utilizadas para detecção foram 488 nm até 520 nm para SYTO-9 e 561 nm até 620 nm para iodeto de propídio. As amostras de biofilme analisadas foram provenientes do 15º ciclo de TFDa para cada um dos FS e amostras sem tratamento foram utilizadas para fins de comparação.

3.15. Avaliação da Internalização dos fotossensibilizadores nas amostras de biofilme

A internalização dos fotossensibilizadores foi avaliada qualitativamente através da microscopia de fluorescência confocal (CLSM) (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan). As amostras de biofilme maduro foram preparadas de acordo com a sessão 3.9 (em placas de 24 poços) e incubadas com os FS durante 10 minutos. As faixas de lasers utilizadas desde a excitação até o limite espectral para detecção foram de 561 nm até 700 nm para azul de metileno/clorina-e6 e 488 nm até 530 nm para curcumina. Foram avaliados campos equidistantes de uma mesma amostra, para verificar se a penetração dos agentes fotossensíveis foi homogênea.

3.16. Perfil de sensibilidade ao metronidazol

Para investigar se o *pool* bacteriano coletado era susceptível ou não ao tratamento com metronidazol, foram confeccionadas placas de Petri contendo ágar sangue de carneiro suplementado com hemina e menadiona, como descrito no item 3.3. O teste foi feito de acordo com o protocolo estabelecido pelo manual CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), por meio da técnica de ágar diluição (devido ao caráter fastidioso das bactérias periodontais), sendo incorporadas as seguintes concentrações de metronidazol (Sigma Chemical Co - St. Louis, MO, EUA) às placas de meio de cultura: 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL, 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, 1000 mg/mL. O inóculo semeado foi corresponde a 1×10^4 UFC/mL e foi espalhado sobre a placa com o auxílio de uma alça Drigalski (Labor plast – Cassinetta di Lugagnano, Itália). A incubação foi realizada por 96 horas a 37°C, em atmosfera livre de oxigênio, com posterior contagem de UFC para verificação de concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico.

3.17. Análise estatística

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados testes de Análise de Variância (ANOVA – one way). A avaliação da diferença entre os grupos foi verificada através de teste de Tukey. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%,

ou seja, $p < 0.05$. O Coeficiente de Variação (desvio padrão/média) máximo aceitável estipulado foi de 25%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Redução bacteriana

O emprego da TFDa em micro-organismos da cavidade oral em fase planctônica tem obtido resultados expressivos, demonstrando efetividade antimicrobiana contra importantes periodontopatógenos como: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Qin et al, 2008; Chan e Lai, 2003, Willians et al, 2003; Goulart et al., 2010).

A ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica é dependente da relação entre concentração do FS e dose de luz a ser empregada. Tendo em vista que diversas combinações desses parâmetros são possíveis, neste trabalho, foi necessário realizar um rastreamento das concentrações em função das doses de luz, a fim de se obter condições sub ótimas de redução bacteriana.

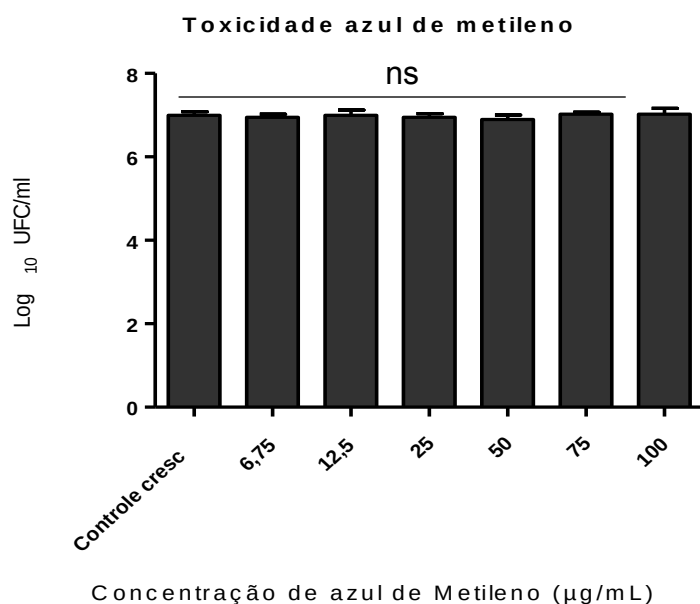
4.2.1. Terapia fotodinâmica em fase planctônica com azul de metileno

Os estudos foram iniciados com a utilização do azul de metileno como FS. Para tanto, foi necessário verificar sua toxicidade nas concentrações avaliadas na ausência de irradiação. O FS não deve apresentar atividade tóxica no escuro, esta é uma condição essencial para avaliar sua atividade fotodinâmica. Na figura 10 pode-se observar que nenhuma das concentrações de azul de metileno empregadas se mostraram tóxicas.

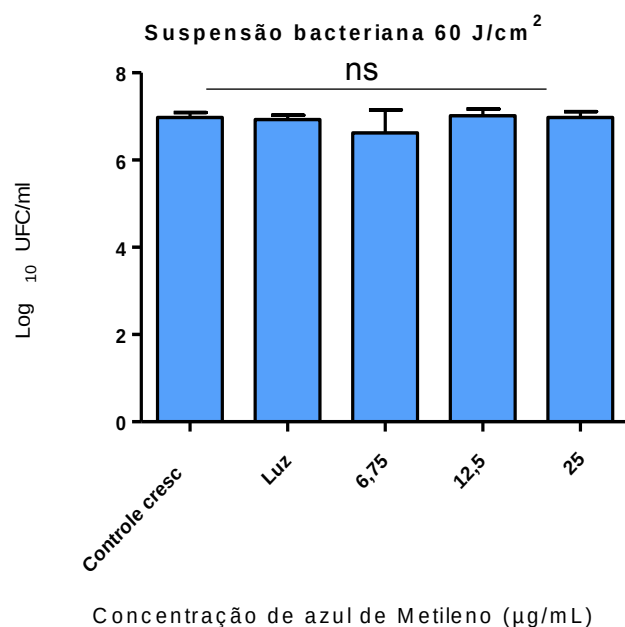
Os demais grupos analisados foram: controle de crescimento, grupo luz e grupo TFDa.

No grupo TFDa as seguintes concentrações de azul de metileno foram testadas: 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e as doses de luz usadas foram 60; 100 e 120 J/cm^2 , conforme mostram as figuras 11 e 12 e 13.

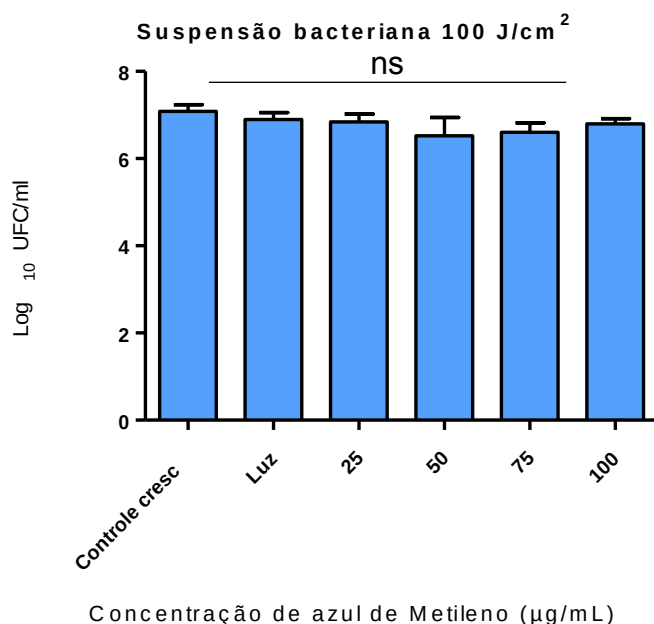
Nenhuma das doses de luz usadas provocaram redução bacteriana significativa. Portanto é seguro afirmar que todo efeito tóxico encontrado é fruto da ação fotodinâmica da associação das doses de luz com concentrações do FS.

Figura 10 - Ação do azul de metileno no escuro sobre os micro-organismos

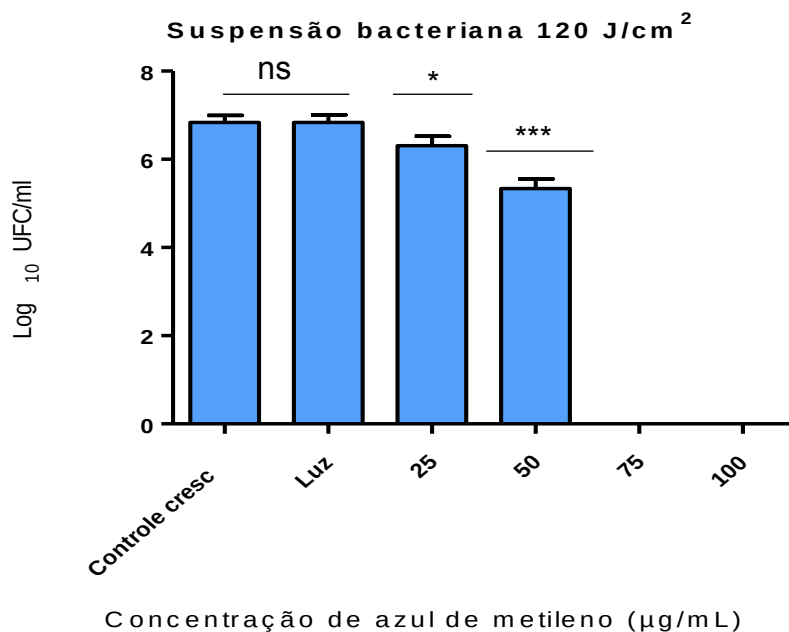
Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de azul de metileno. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 11 - Ação da TFDa com azul de metileno

Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 12 - Ação da TFDa com azul de metileno

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 13 - Ação da TFDa com azul de metileno

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *p<0,05; ***p<0,001; ns: não significativo.

As figuras 11 e 12, demonstram que não houve redução microbiana significativa em relação ao grupo controle de crescimento. Diante disso, optamos por aumentar a dose de luz para 120 J/cm^2 (Figura 13), onde foi observado a eliminação total dos micro-organismos a partir de 75 µg/mL de azul de metileno. A concentração de 50 µg/mL , associada a essa mesma dose de luz proporcionou $1,67 \log_{10}$ de redução, sendo este o parâmetro escolhido para realização dos ensaios de indução de resistência via múltiplos ciclos de TFDa.

O resultado encontrado se assemelha com os achados de Wilson et al, (1993), que demonstraram a efetividade do azul de metileno irradiado por laser de baixa intensidade (He-Ne) em patógenos periodontais. Outro estudo similar utilizando azul de metileno, contra micro-organismos orais, resultou em uma redução de 95-100% ($1 \log_{10}$) (Chan; Lai., 2003). Fontana et al. (2009), também avaliaram em fase planctônica, a efetividade da TFDa mediada por azul de metileno, em amostras de placa subgengival de indivíduos com periodontite crônica. A TFDa inviabilizou 63 % das espécies com a utilização de 25 µg/mL de FS exposto a 30 J/cm^2 .

Em um experimento de Soukos et al (2006), foi testado a susceptibilidade de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra* e *E. faecalis*, frente a aplicação de TFDa nos seguintes parâmetros: 25 mg/mL e uma fluência de 30 J/cm^2 . A redução dos micro-organismos estudados atingiu 97% ($2 \log_{10}$). Os autores concluíram que a TFDa em associação com azul de metileno tem potencial para ser utilizado como coadjuvante à terapia periodontal.

4.2.2. Terapia fotodinâmica em fase planctônica com clorina-e6

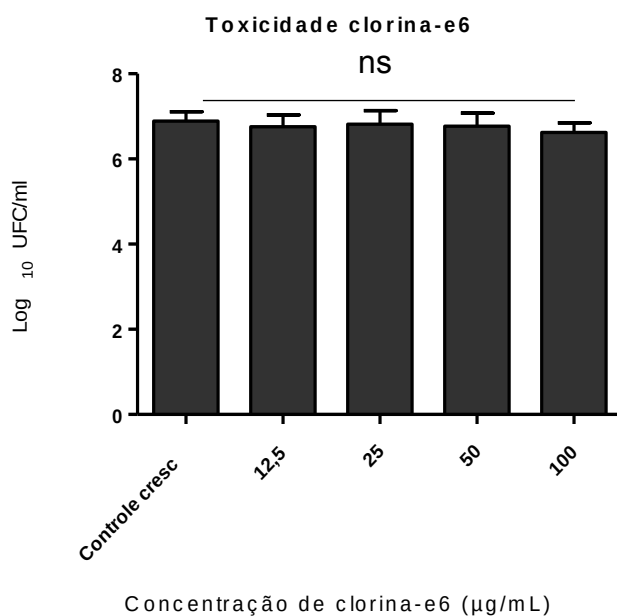
Os experimentos envolvendo os testes de toxicidade no escuro, revelaram que a clorina-e6 isolada não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das culturas dos periodontopatógenos coletados da placa subgengival, frente ao grupo controle de crescimento (Figura 14). Isoladamente, as doses de luz utilizadas também não culminaram em redução bacteriana significativa.

A figura 15 nos mostra que o parâmetro tomado como ideal para a condução dos ciclos de resistência foi atingido por meio da utilização da dose de luz de 25 J/cm^2 combinada a concentração de 100 µg/mL do FS ($p < 0,001$ em relação ao grupo controle de crescimento). Resultando em $1,91 \log_{10}$ de redução.

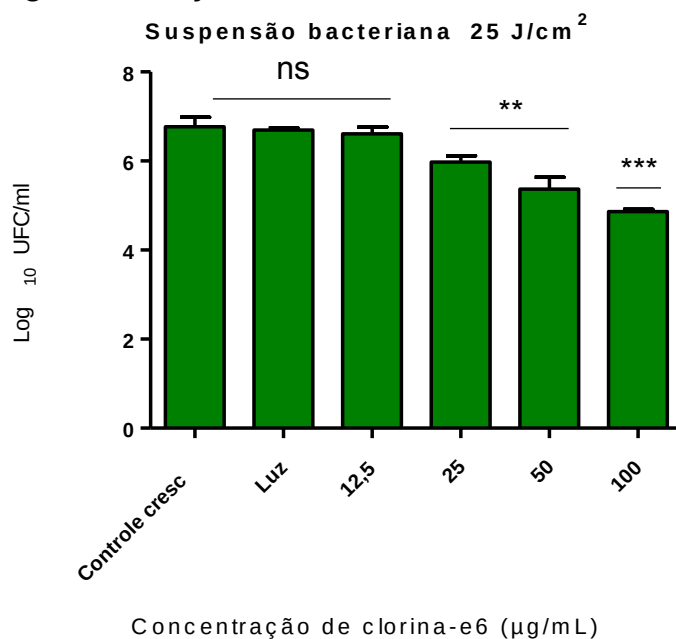
É possível observar através de análise na figura 16, que a ação da redução da TFDa não ocorre de forma linear e gradual a medida em que se aumenta a

concentração de FS e/ou dose de luz empregada. Pois com o acréscimo de apenas 5 J/cm², houve a eliminação total das bactérias com as mesmas concentrações testadas anteriormente.

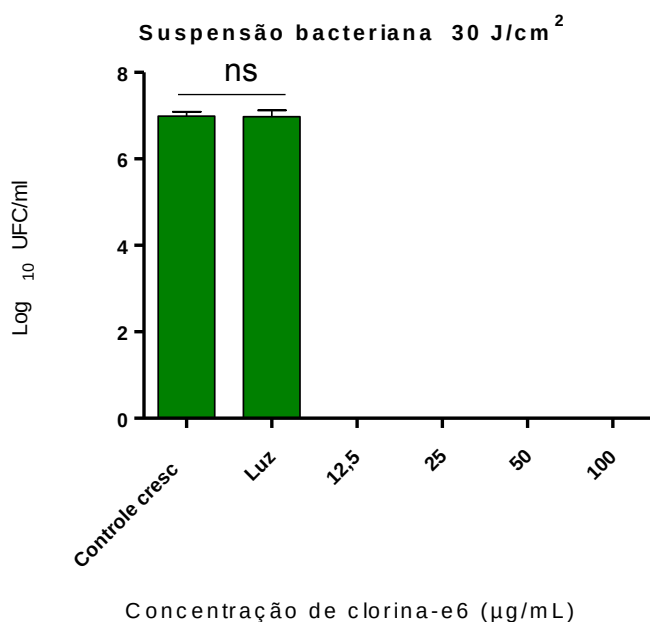
Figura 14 - Ação da clorina-e6 no escuro sobre os micro-organismos



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de clorina-e6. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 15 - Ação da TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

Figura 16 - Ação da TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Pfitzner et al (2004), com a administração de clorina-e6 sob a dose de luz de 5 J/cm², eliminou *in vitro* 100% dos seguintes patógenos periodontais estudados: *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *C. gingivalis*.

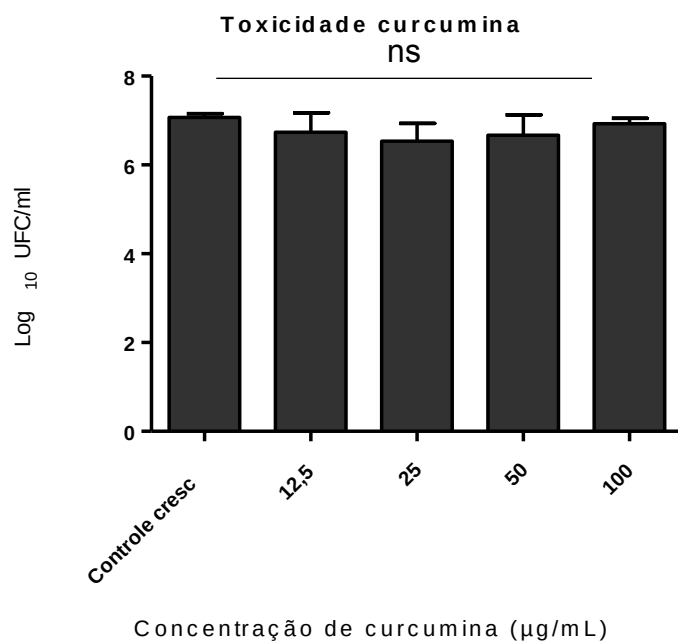
A atividade *em vitro* da TFDa + clorina-e6, tem mostrado eficácia letal contra diversos patógenos periodontais, como foi avaliado por Rovald et al (2000), obtendo reduções significativas em: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomytans*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*. De modo semelhante, e comprovando tal efetividade relatada anteriormente, Ali-al-ahmad (2016) encontrou reduções de 99% a 99,9% (2 log₁₀ e 3 log₁₀, respectivamente) nos seguintes patógenos periodontais aplicando TFDa +100 µg/mL de clorina-e6: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomytans*, *E. corrodens*, *A. odontolyticus*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *S. exíqua* e *A. rimae*.

Diante disso, o resultado encontrado neste ensaio corrobora com os dados disponíveis na literatura, mostrando que a TFDa associada a este FS, pode ser uma ferramenta em potencial para o tratamento da periodontite.

4.2.3. Terapia fotodinâmica em suspensão com curcumina

Para a curcumina, o terceiro FS estudado, avaliamos também sua toxicidade no escuro em contato com o *pool* bacteriano (Figura 17). Novamente o FS, nas concentrações testadas, não se mostrou prejudicial ao inóculo. Não havendo diferença estatística relevante frente ao grupo controle de crescimento.

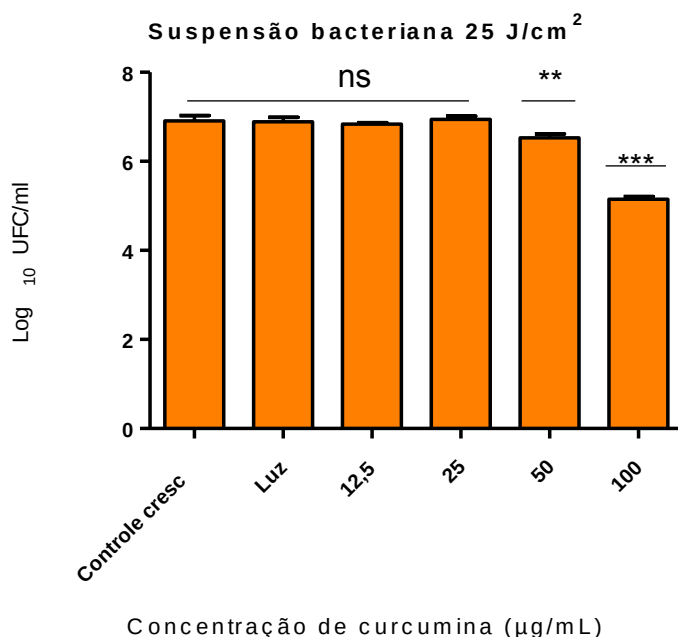
Figura 17- Ação da curcumina no escuro sobre os micro-organismos



Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de curcumina. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

O parâmetro sub ótimo de irradiação e concentração de curcumina, para conduzir os ensaios de indução de resistência foi definido em 100 $\mu\text{g/mL}$ associado a 25 J/cm^2 . Atingindo uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle de crescimento ($p < 0,001$), a qual correspondeu a 1,76 $\log_{10}$, conforme mostra a figura 18.

Figura 18- Ação da TFDa com curcumina

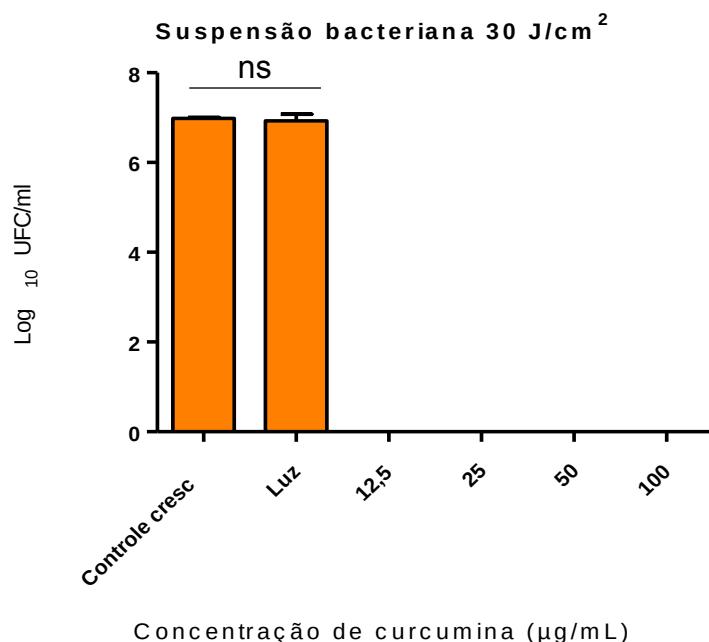


Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

O desempenho da curcumina foi semelhante ao resultado observado anteriormente, com clorina-e6 obtendo índices de redução parecidos (1,76 e 1,91 log₁₀, respectivamente) sob a mesma dose de luz e concentração de FS.

Assim como encontrado nos ensaios com clorina-e6, apenas com o acréscimo de 5 J/cm² (Figura 19) na dose de luz, foi possível atingir 100% de morte dos micro-organismos, inviabilizando a administração da fluência de 30 J/cm² nos ciclos de indução de resistência.

Figura 19- Ação da TFDa com curcumina



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem confirmado o potencial terapêutico da curcumina, como um antibacteriano com potencial na descontaminação oral (Richards et al., 1999, Haukvik et al., 2009). Araújo et al (2012), avaliaram a susceptibilidade geral de patógenos da saliva na TFDa, após sensibilização com curcumina (5 min), com posterior exposição à luz azul de 450 nm, gerando uma redução de 68% (resultado inferior a 1 log₁₀) da população bacteriana.

Najafi et al (2016), realizaram um estudo *in vitro* utilizando a curcumina (2,5 mg/mL) ativada por luz LED (120 J/cm²) contra *A. actinomycetemcomytans* e concluíram que a TFDa mediada por curcumina é eficaz na prevenção do crescimento de *A. actinomycetemcomytans*.

Sreedhar et al (2015) utilizaram a curcumina como FS na TFDa, no tratamento adjunto de pacientes com doença periodontal crônica. Os sítios tratados com a TFDa, revelaram uma redução significativa dos patógenos periodontais, quando comparados com sítios tratados apenas com o debridamento mecânico. Este estudo mostrou também que os parâmetros clínicos e microbiológicos foram melhorados com a administração de múltiplas aplicações da terapia.

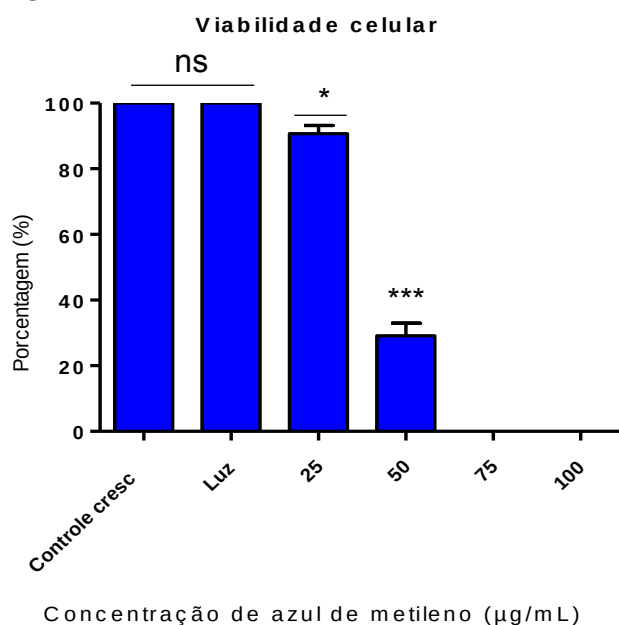
Os dados microbiológicos de UFC/mL, apresentados nesta seção, reforçam ainda mais os resultados satisfatórios da curcumina como possível FS na inativação de micro-organismos periodontopatogênicos.

4.3. Avaliação da viabilidade celular

Complementarmente a contagem de UFC/mL, o teste colorimétrico de redução da resazurina em resorufina foi empregado para avaliar a viabilidade celular das amostras sujeitas a TFDa, em fase planctônica. Os parâmetros de TFDa utilizados para a aplicação do teste foram: 120 J/cm² associados as concentrações de 25; 50; 75 e 100 µg/mL de azul de metileno. E 25 J/cm² combinado as concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL para clorina-e6 e curcumina.

A figura 20 nos mostra que ocorreu uma redução de 70,84% de metabolismo celular, quando a TFDa é mediada por azul de metileno na concentração de 50 µg/mL, sob a dose de luz correspondente a 120 J/cm².

Figura 20– Viabilidade celular azul de metileno

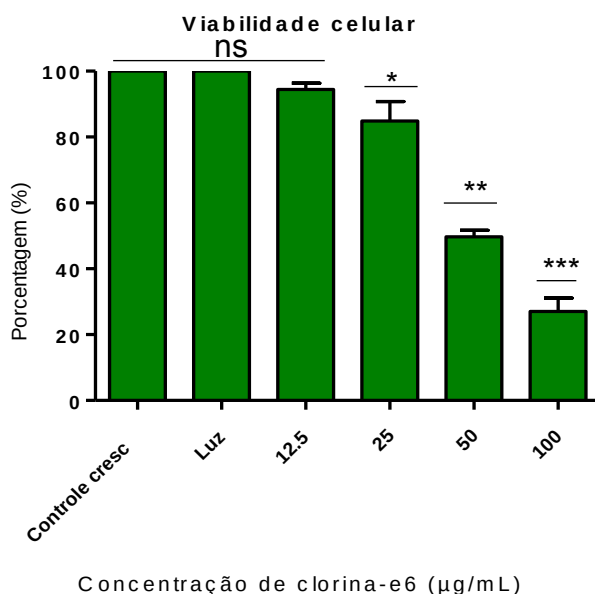


Porcentagem de redução na viabilidade celular entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de azul de metileno utilizadas na TFDa irradiadas com a dose de luz de 120 J/cm². As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *p<0,05 ***p<0,001; ns: não significativo.

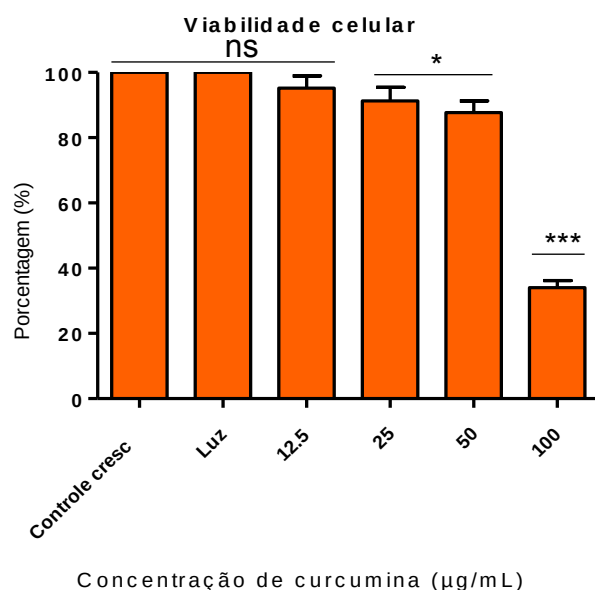
Os resultados obtidos neste ensaio, após a aplicação de TFDa com a utilização de clorina-e6, mostraram uma viabilidade celular afetada em 73% com o emprego de

100 µg/mL de FS sob a fluência de 25 J/cm². A curcumina revelou uma porcentagem de viabilidade celular de 34 % com a utilização desses mesmos parâmetros de concentração e dose de luz (Figuras 21 e 22 respectivamente).

Figura 21– Viabilidade celular clorina-e6



Porcentagem de redução na viabilidade celular entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de clorina-e6 utilizadas na TFda irradiadas com a dose de luz de 25 J/cm². As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

Figura 22– Viabilidade celular curcumina

Porcentagem de redução na viabilidade celular entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de curcumina utilizadas na TFDa irradiadas com a dose de luz de 25 J/cm². As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *p<0,05; ***p<0,001; ns: não significativo.

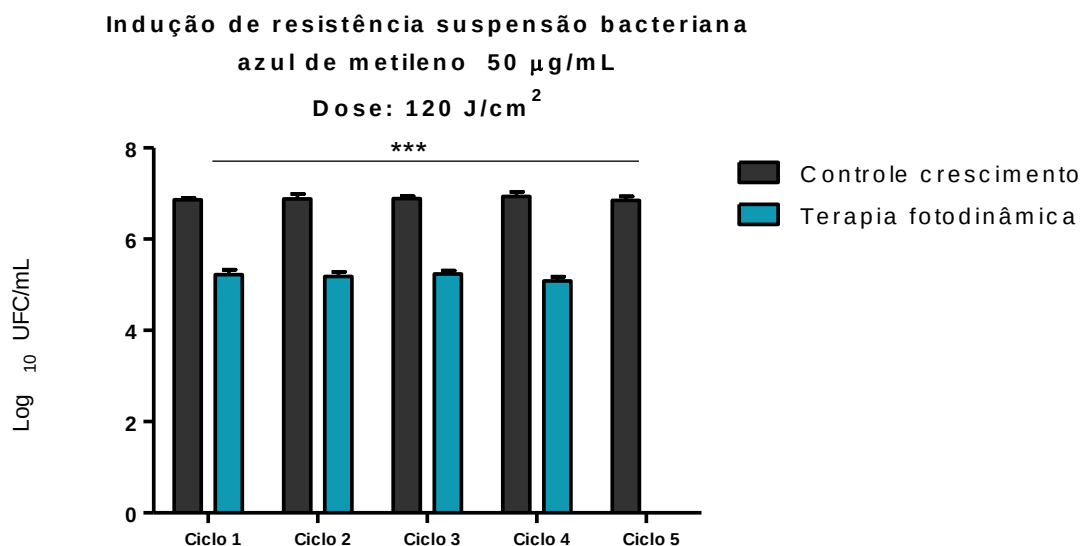
4.4. Ciclos de indução de resistência em fase planctônica

Sabe-se que o uso repetido de agentes antimicrobianos em concentrações sub-letais, pode levar ao desenvolvimento de populações bacterianas mais resistentes, ou ao menos mais tolerantes à maior concentração desses agentes (Mcmahon, et al. 2008). Diante disso, e após a realização do rastreamento para encontrar as condições de tratamento sub ótimos da terapia com o emprego de cada um dos FS, foram conduzidos os ciclos de exposição do *pool* bacteriano à TFDa, com o objetivo de investigar o potencial de desenvolvimento de resistência desses micro-organismos.

Após 4 ciclos com a redução esperada de micro-organismos, em relação ao grupo controle de crescimento, foi constatada a eliminação total da carga de micro-organismos ao fim do 5º ciclo, ou seja, não houve manifestação do perfil de resistência (Figura 23). Foi observado a morte abrupta do *pool* bacteriano entre o 4º e 5º ciclo e não uma redução gradual entre cada uma das etapas de exposição à TFDa. Um comportamento similar a este ocorrido foi observado anteriormente nos experimentos

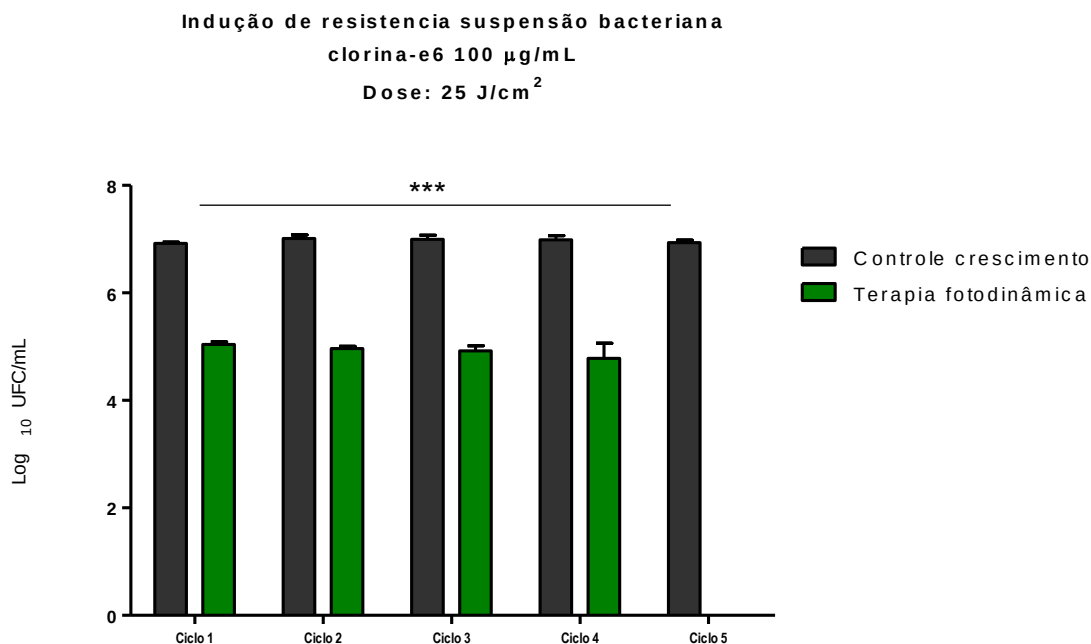
envolvendo o rastreamento dos parâmetros sub ótimos de TFDa com clorina-e6 e curcumina (item 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente).

Figura 23– Ciclos consecutivos de TFDa com azul de metileno

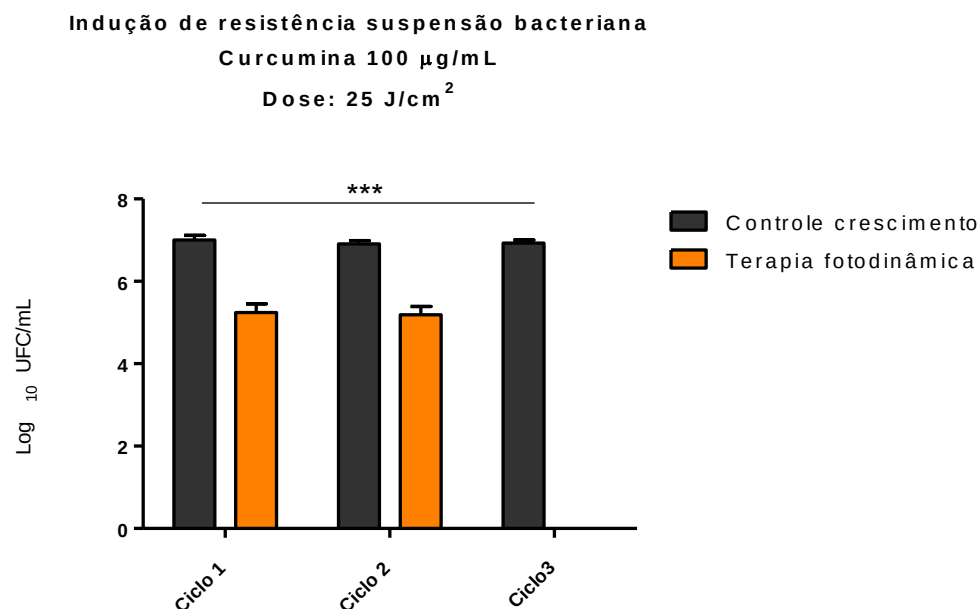


Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

Este comportamento de redução repentina após determinado ciclo de TFDa também se repetiu com os parâmetros selecionados para clorina-e6 (Figura 24) e curcumina (Figura 25), com ambos ocasionando a morte total das bactérias no 5º ciclo e 3º ciclo, respectivamente.

Figura 24– Ciclos consecutivos de TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

Figura 25– Ciclos consecutivos de TFDa com curcumina

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

Avaliando estes resultados podemos concluir, inicialmente, que a TFDa não conferiu o perfil de resistência no *pool* de bactérias, mas, ao contrário disso a sua aplicação sucessiva favoreceu a redução total da carga bacteriana em parâmetros que anteriormente eram tidos como sub ótimos.

Outros estudos de indução de resistência à TFDa foram realizados em diversas espécies de micro-organismos e obtiveram a mesma conclusão:

Al-mutairi et al (2018), em sua pesquisa concluíram que mesmo após 10 ciclos de TFDa em condições sub inibitórias, as cepas de *E. coli* e *S. aureus* não manifestaram resistência.

Tavares e colaboradores (2010) reportaram que após 10 ciclos de inativação parcial e recuperação, nenhuma das duas cepas avaliadas (*Vibrio fischeri* e *Escherichia coli*) desenvolveu resistência à TFDa

Giuliani et al (2010), submeteram a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* à 20 ciclos de TFDa, sub condições sub inibitórias, e ambas foram incapazes de manifestar resistência.

Zhu et al (2014), ao submeterem *Acinetobacter baumannii* à 10 ciclos de inativação sub letal via TFDa com luz azul, seguidos de re-crescimento, não mostraram evidencia do surgimento de tolerância.

É possível que a aplicação de TFDa de maneira consecutiva possa ocasionar alguma forma de estresse oxidativo nas células bacterianas afetando sua viabilidade ao longo do tempo, provavelmente, pelo fato do mecanismo de ação antimicrobiano da TFDa não ser específico, agindo em diversos substratos biológicos e reduzindo a atividade bacteriana através da atuação em fatores de virulência como lipopolissacarídeos e proteases, diminuindo seus efeitos patológicos.

4.5. Terapia fotodinâmica em fase de biofilme

O acúmulo de biofilme microbiano específico no espaço entre o epitélio e a superfície dental, leva a inflamação e a formação da bolsa periodontal. Desse modo, a formação de um complexo biofilme múltipla espécie é o principal agente etiológico da doença periodontal *in vivo*.

Existem diversos relatos da ação antimicrobiana da TFD em bactérias que se encontravam em fase planctônica (Dobson, Wilson et al., 1992; Willians et al., 2004; Zanin et al., 2007; Wood et al., 1999; O'Neill et al., 2002).

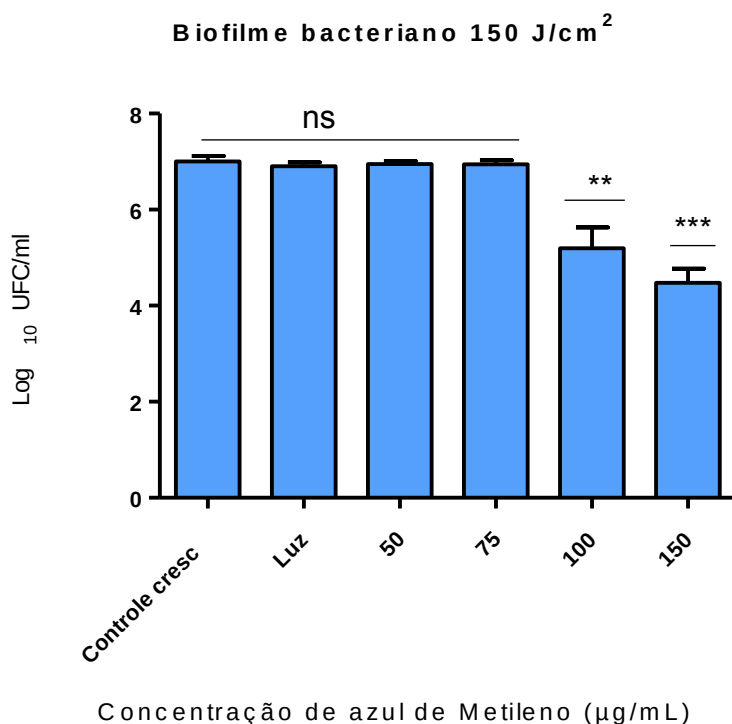
A concentração de FS e a dose de luz necessária para ocorrer a foto-inativação de biofilmes são consideravelmente mais elevadas do que as utilizadas em suspensões bacterianas (Kashef; Karame; Djavid, 2015; Usecheva; Teichert; Biel, 2001). Porém, pesquisas anteriores mostraram que o oxigênio singlete é capaz de agir diretamente nas moléculas da matriz extracelular dos biofilmes, degradando polissacarídeos e deixando os micro-organismos mais vulneráveis à ação fotoquímica da TFDa, diferentemente do que ocorre com a terapia antibiótica (Soukos et al., 2003; Konopla; Goslinski, 2007).

Alguns relatos da literatura mostram uma menor eficiência da aTFD frente aos biofilmes, com destruição incompleta dos patógenos orais (Soukos et al., 2003; Ogura et al, 2007; Muller et al 2007; Fontana et al, 2009). Tendo em vista este cenário, buscamos aumentar as doses de luz e concentração dos FS empregados, com o intuito de atingirmos reduções significativas na viabilidade do biofilme. Neste trabalho, apesar da TFDa não ter erradicado 100% dos micro-organismos, ainda foi capaz de promover reduções significativas dos patógenos frente aos grupos controle de crescimento.

4.5.1. Terapia fotodinâmica em biofilme com azul de metileno

Por conta das características da matriz polimérica extracelular na proteção do biofilme (Taraszkiewicz, 2013), optamos por iniciar a etapa de rastreamento com uma dose de luz de 150 J/cm^2 e concentração máxima testada de $150 \text{ }\mu\text{g/mL}$ a fim de evitar que o FS se torne uma barreira ótica para penetração da luz.

Após a aplicação da TFDa foi constatada a redução de $2,53 \log_{10}$ ($p < 0,001$) na concentração de $150 \text{ }\mu\text{g/mL}$ (Figura 26). Sendo este o parâmetro selecionado para realização dos ciclos de exposição à TFDa.

Figura 26- Ação da TFDa com azul de metileno

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

Fontana et al (2009), avaliaram o efeito da TFDa com luz vermelha, em biofilmes de placa dental, derivados de pacientes com doença periodontal crônica. A morte máxima atingida foi de 32% (redução inferior a 1 log₁₀), com o emprego de 25 µg/mL ou 50µg/mL de azul de metileno, uma taxa de mortalidade muito abaixo da atingida neste trabalho.

Um resultado semelhante ao encontrado na presente pesquisa foi descrito por Alvarenga et al (2015), o qual avaliou a viabilidade de um biofilme composto por *A. actinomycetemcomitans* exposto a luz vermelha na presença de azul de metileno. A TFDa foi capaz de reduzir a carga bacteriana em um nível de 99,85% (3 log₁₀), e com isso alterando a estrutura do biofilme subgengival.

Fimpe et al (2008), investigou o efeito fotodinâmico do azul de metileno em um biofilme múltipla espécie composto por: *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Os parâmetros usados foram 25 µg/mL + 30 J/cm², e a UFC revelou 80% (redução inferior a 1 log₁₀) de morte neste biofilme. Outro trabalho aplicando TFDa,

usando azul de metileno, resultou em 4 log₁₀ de redução na viabilidade de um biofilme composto por *P. gingivalis* (Braham et al., 2009).

A partir desses achados e também do resultado encontrado neste estudo, pode-se concluir que a TFDa pode ser uma terapia promissora para o tratamento de patógenos orais também na fase de biofilme.

4.5.2. Terapia fotodinâmica em biofilme com clorina-e6

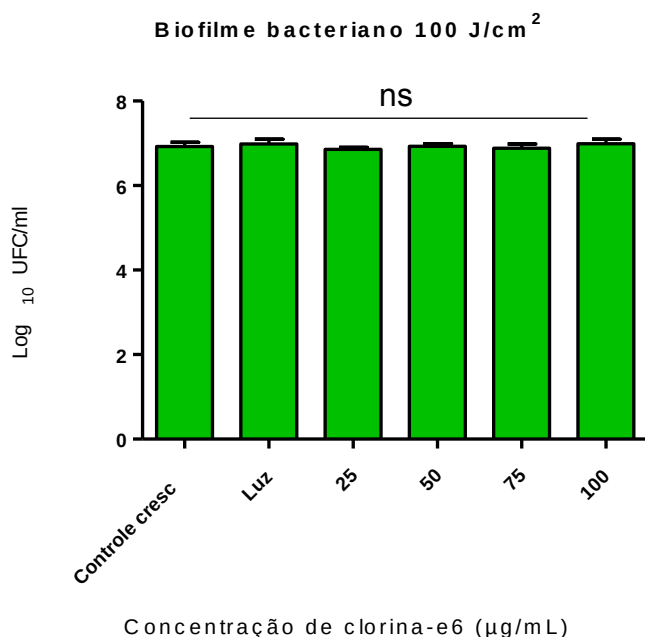
Em relação a clorina-e6, aplicamos inicialmente a dose de luz de 100 J/cm², associada as concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL (Figura 27). Nesta condição, não foi registrado qualquer efeito significativo de redução quando comparado ao grupo controle de crescimento.

Aumentamos a concentração de clorina-e6 para 150 µg/mL bem como a dose de luz para 120 J/cm² (Figura 28), visando alcançar uma condição de redução do biofilme entre 1 log₁₀ e 3 log₁₀, e novamente não houve redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle de crescimento. Porém com o emprego de 150 J/cm² de fluência e 100 µg/mL foi alcançado 1,47₁₀ log de redução microbiana (p<0,001) (Figura 29), o que nos levou a optar por esta condição para a performance dos ciclos de indução de resistência, tendo em vista que não houve diferença estatística desta concentração, frente a concentração de 150 µg/mL.

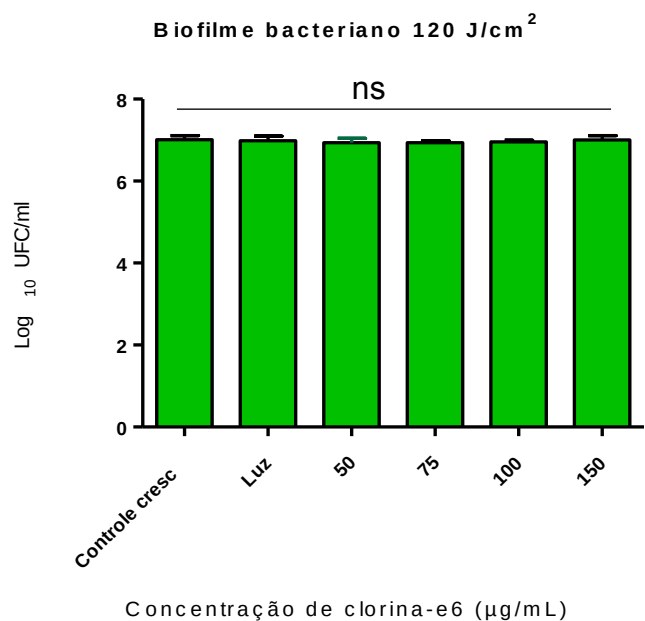
Ali-al-ahmad (2016) por meio de TFDa em associação com clorina-e6 (100 µg/mL), obteve reduções superiores a 2 log₁₀ nos micro-organismos aeróbios e anaeróbios presentes no biofilme oral sub gengival *in situ*. Redução semelhante a que foi constatada neste trabalho.

Sigusch et al (2005), utilizando *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *C. gingivalis*., também avaliou o efeito da TFDa mediada por clorina-e6, porém em um modelo *in vivo* utilizando cães infectados com tais bactérias. O resultado encontrado mostrou uma redução de 2 log₁₀ de UFC/mL para *P. gingivalis* nos sítios infectados.

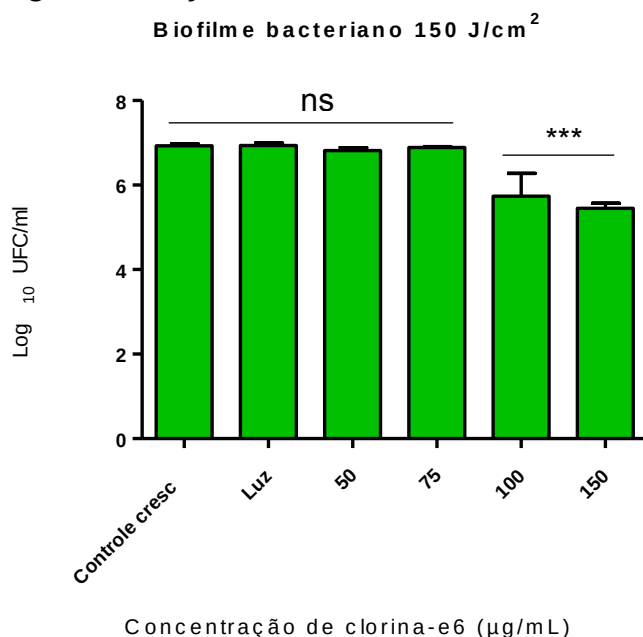
Um outro estudo, descreve eficácia do uso de clorina-e6 como FS para o emprego de TFDa. Drulis-Kawa et al (2005), relatou uma redução de 2 a 6 log₁₀ em bactérias periodontais.

Figura 27- Ação da TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 28- Ação da TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

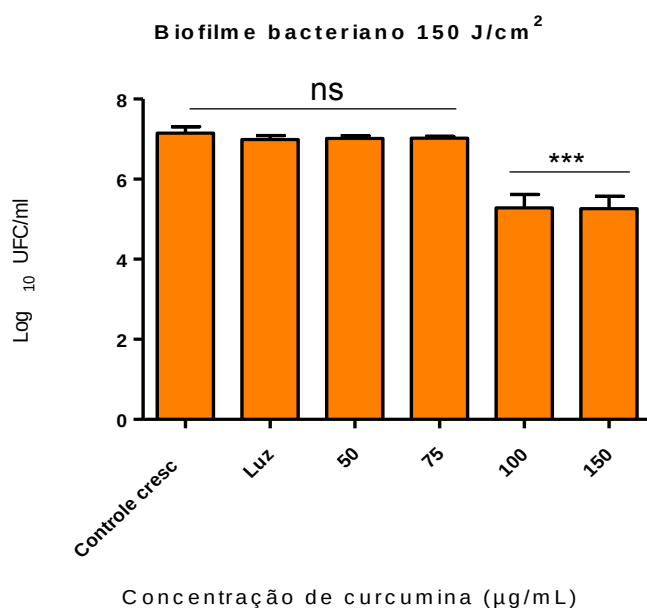
Figura 29- Ação da TFDa com clorina-e6

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001; ns: não significativo.

A atividade bactericida significativa revelada através desses estudos e da presente pesquisa, contra patógenos periodontais em fase de biofilme, enfatiza a eficiência da clorina-e6 como FS.

4.5.3. Terapia fotodinâmica em biofilme com curcumina

O parâmetro selecionado para realização dos ciclos de indução de resistência via TFDa para curcumina foi utilizando 100 µg/mL e 150 J/cm² de dose de luz. Conforme exibido na figura 30, este tratamento gerou um decréscimo de 1,88 log₁₀ (p<0,001).

Figura 30 - Ação da TFDa com curcumina

Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle de crescimento, grupo luz e TFDa. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

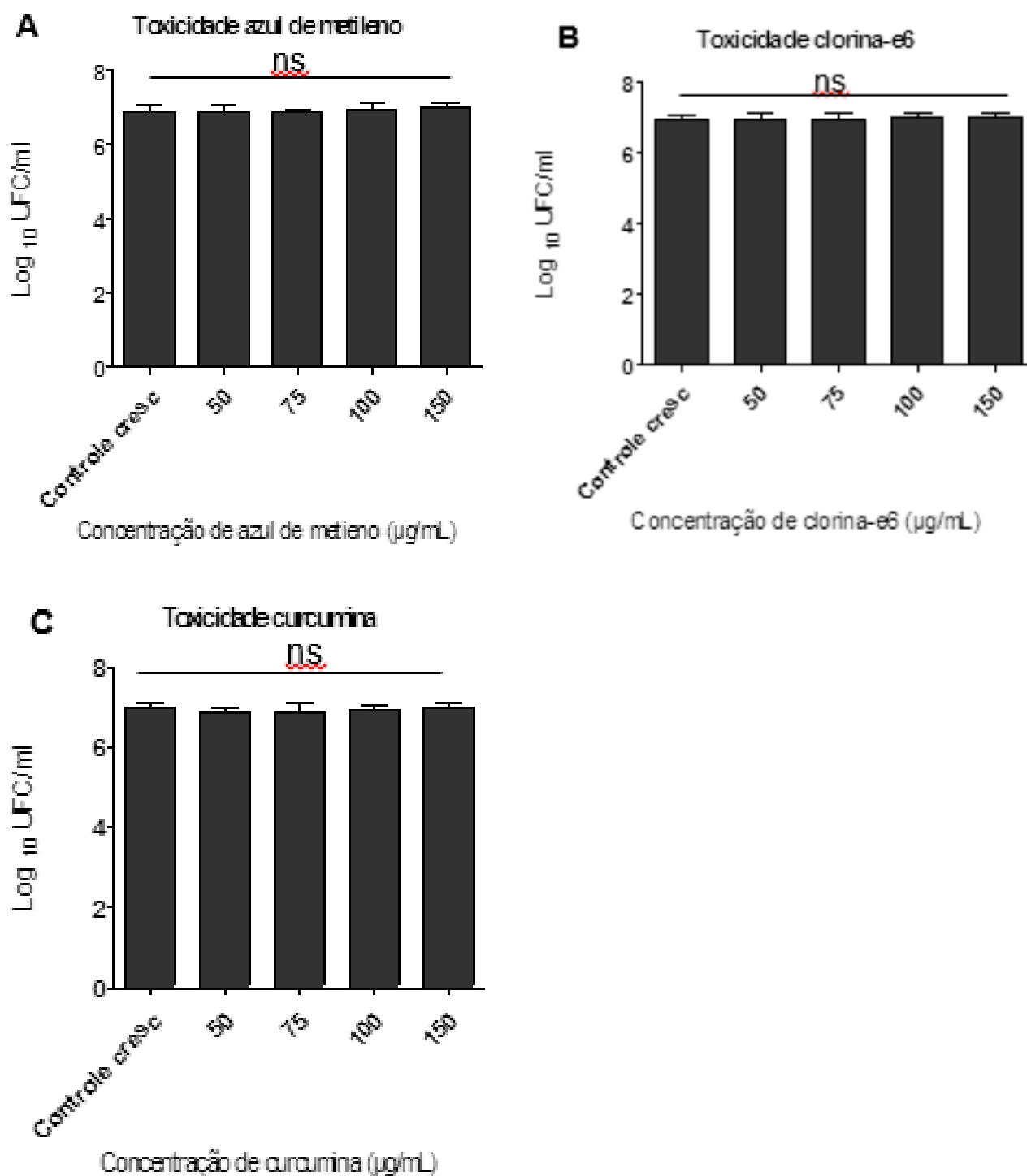
Os experimentos envolvendo a toxicidade no escuro de cada um dos FS utilizados nos ensaios, revelaram que as concentrações testadas não resultaram em morte bacteriana (Figura 31).

A curcumina, assim como o azul de metileno e clorina-e6, mostrou um FS com potencial de redução sobre patógenos orais. Conforme mostra o estudo de Araujo et al (2016), o qual foram coletadas saliva de 13 voluntários. A curcumina foi utilizada para sensibilizar as amostras e posteriormente se deu a irradiação, resultando em uma diminuição de 68% (menos que 1 $\log_{10}$) nas bactérias.

Biofilmes orais também foram avaliados por Araújo, Fontana e Bagnato, com a TFDa sendo utilizada em associação com as seguintes concentrações de curcumina: 0,75; 1,5; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL e dose de luz de 5,7 J/cm². Uma redução significativa foi encontrada na viabilidade celular ($p < 0,05$).

A curcumina novamente revelou ser um FS com potencial fotodinâmico, a ser utilizado em um possível caso de tratamento alternativo de doenças infecciosas causadas por micro-organismos orais.

Figura 31- Ação dos FS no escuro sobre os micro-organismos



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de azul de metileno (A), clorina-e6 (B) e curcumina (C). As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: (não significativo), representa a diferença estatística entre os grupos e o controle sem tratamento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

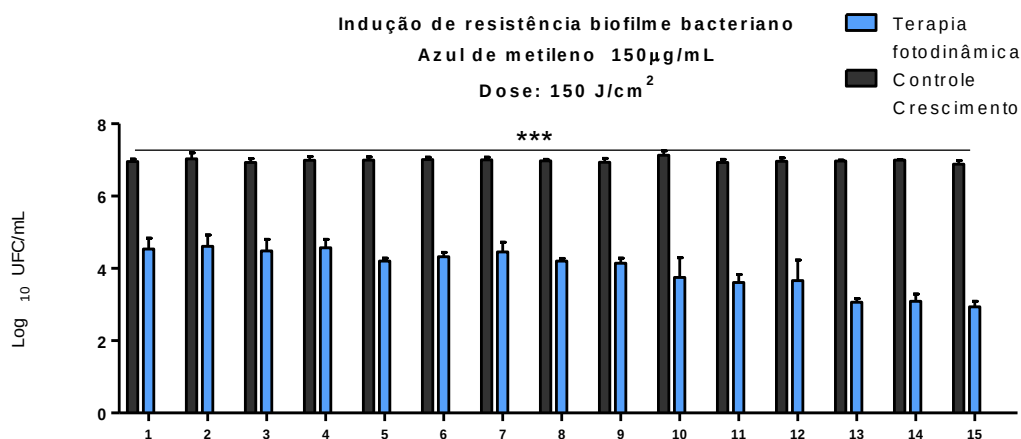
4.6. Ciclos de indução de resistência em biofilme

Definidas as condições sub ótimas da TFDa com cada um dos FS, foram iniciados os ciclos a fim de avaliar se o desenvolvimento de resistência do *pool* bacteriano, até o limite de 15 aplicações seria observado.

Os resultados de redução bacteriana em biofilmes derivados do biofilme dental, foi de encontro com os dados disponíveis na literatura (Soukos et al, 2003; Ogura et al, 2007; Muller et al 2007; Fontana et al, 2009), não sendo capaz de erradicar os micro-organismos em sua totalidade. Porém, foi demonstrado um aumento gradativo na redução bacteriana a medida em que se progredia com a aplicação dos ciclos de TFDa.

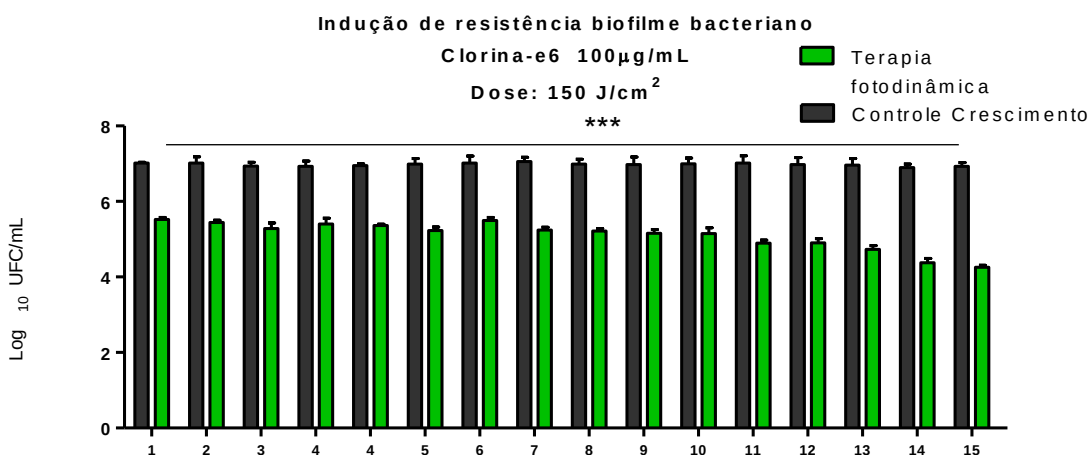
Inicialmente o parâmetro de redução para o FS azul de metileno era de $2,53 \log_{10}$ na primeira aplicação de TFDa, todavia, ao fim da 15ª aplicação a redução bacteriana alcançou $3,95 \log_{10}$ (Figura 32). Evidenciando que mesmo na forma de biofilme, o desenvolvimento de resistência frente a TFDa não ocorreu. O mesmo padrão se repetiu com a clorina-e6 (Figura 33) e curcumina (Figura 34), as quais mostraram ao fim dos ciclos um aumento na morte da carga bacteriana, de $1,47 \log_{10}$ para $2,68 \log_{10}$ e $1,88 \log_{10}$ para $2,78 \log_{10}$, respectivamente. Esses parâmetros de morte são relevantes, visto que outros trabalhos encontraram reduções entre 1 a $2.6 \log_{10}$ em biofilmes orais mono-espécie de *Streptococcus mutans* (Metcalf et al, 2006; Wood et al, 1999). Além disso o biofilme cultivado neste estudo foi correspondente a um estágio maduro e composto por múltiplas espécies representativas da doença periodontal, tornando-o muito mais complexo.

Figura 32- Ciclos consecutivos de TFDa com azul de metileno

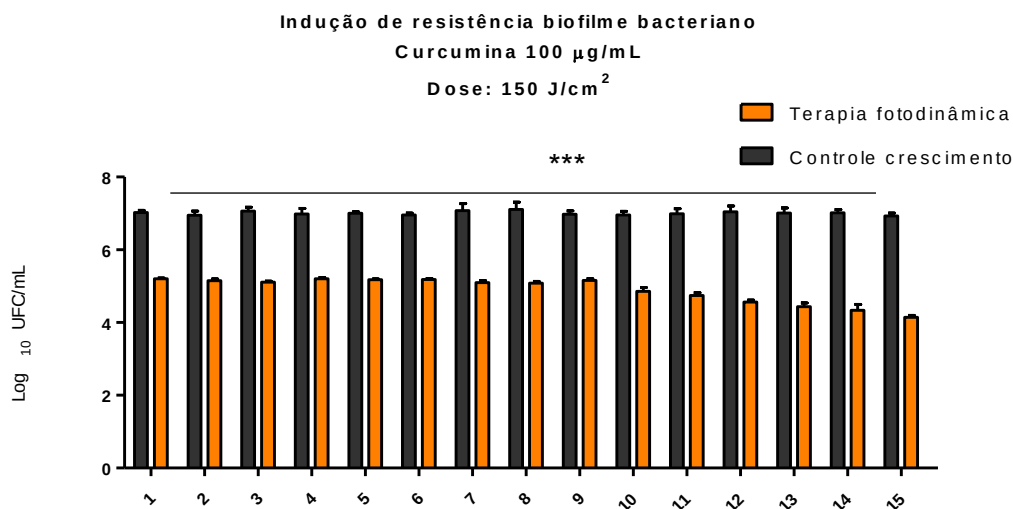


Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

Figura 33- Ciclos consecutivos de TFDa com clorina-e6



Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

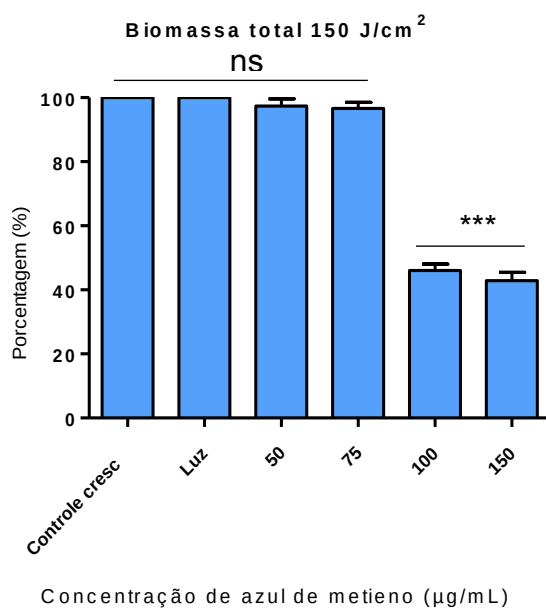
Figura 32- Ciclos consecutivos de TFDa com curcumina

Valores médios de log₁₀ entre os grupos controle de crescimento e TFDa. As colunas representam os valores médios de log₁₀ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ***p<0,001.

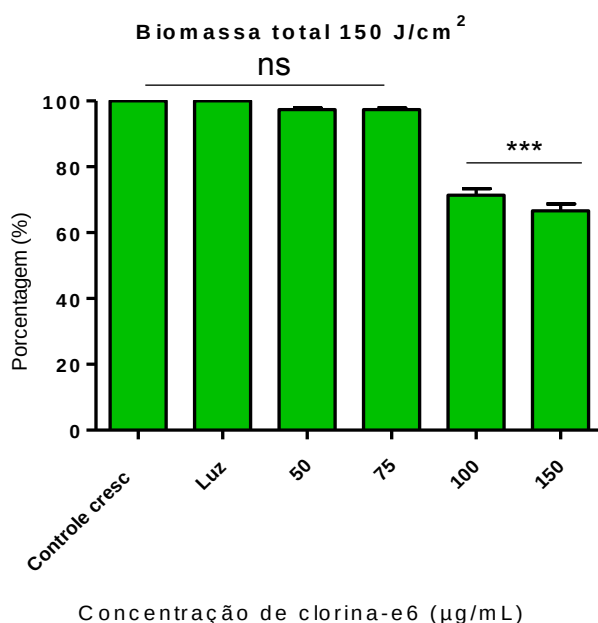
4.7. Quantificação da biomassa total do biofilme.

Foi realizado a quantificação da biomassa total das amostras após os 15 ciclos de TFDa. Terminado o 15º tratamento de TFDa, com azul de metileno sob a concentração de 150 µg/mL associado a dose de luz de 150 J/cm², foi constatado uma redução de 46 % da biomassa deste biofilme (Figura 35). A clorina-e6 (Figura 36) e a curcumina (Figura 37), ambas na concentração de 100 µg/mL e dose de luz de 150 J/cm², resultaram em uma redução de 28,7% e 30.67%, respectivamente, ao fim do 15º ciclo de aplicação de TFDa.

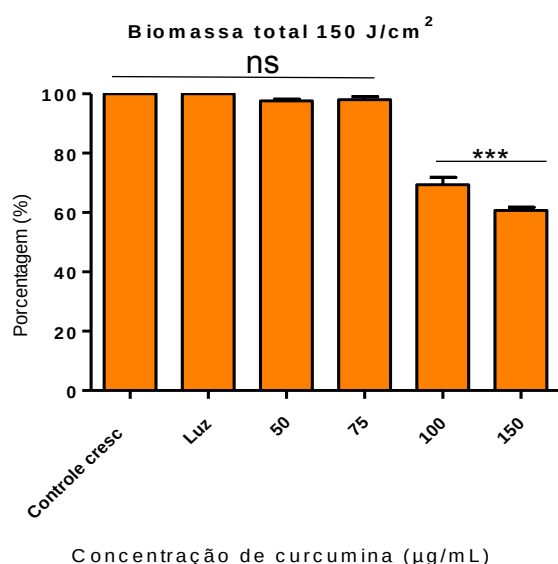
Figura 33– Quantificação da biomassa total após TFDa com azul de metileno



Porcentagem de redução entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de azul de metileno utilizadas no tratamento. As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Figura 34– Quantificação da biomassa total após TFDa com clorina-e6

Porcentagem de redução entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de clorina-e6 utilizadas no tratamento. As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Figura 35– Quantificação da biomassa total após TFDa com curcumina

Porcentagem de redução entre os grupos controle de crescimento e as concentrações de curcumina utilizadas no tratamento. As colunas representam os valores médios de redução em três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle de crescimento (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

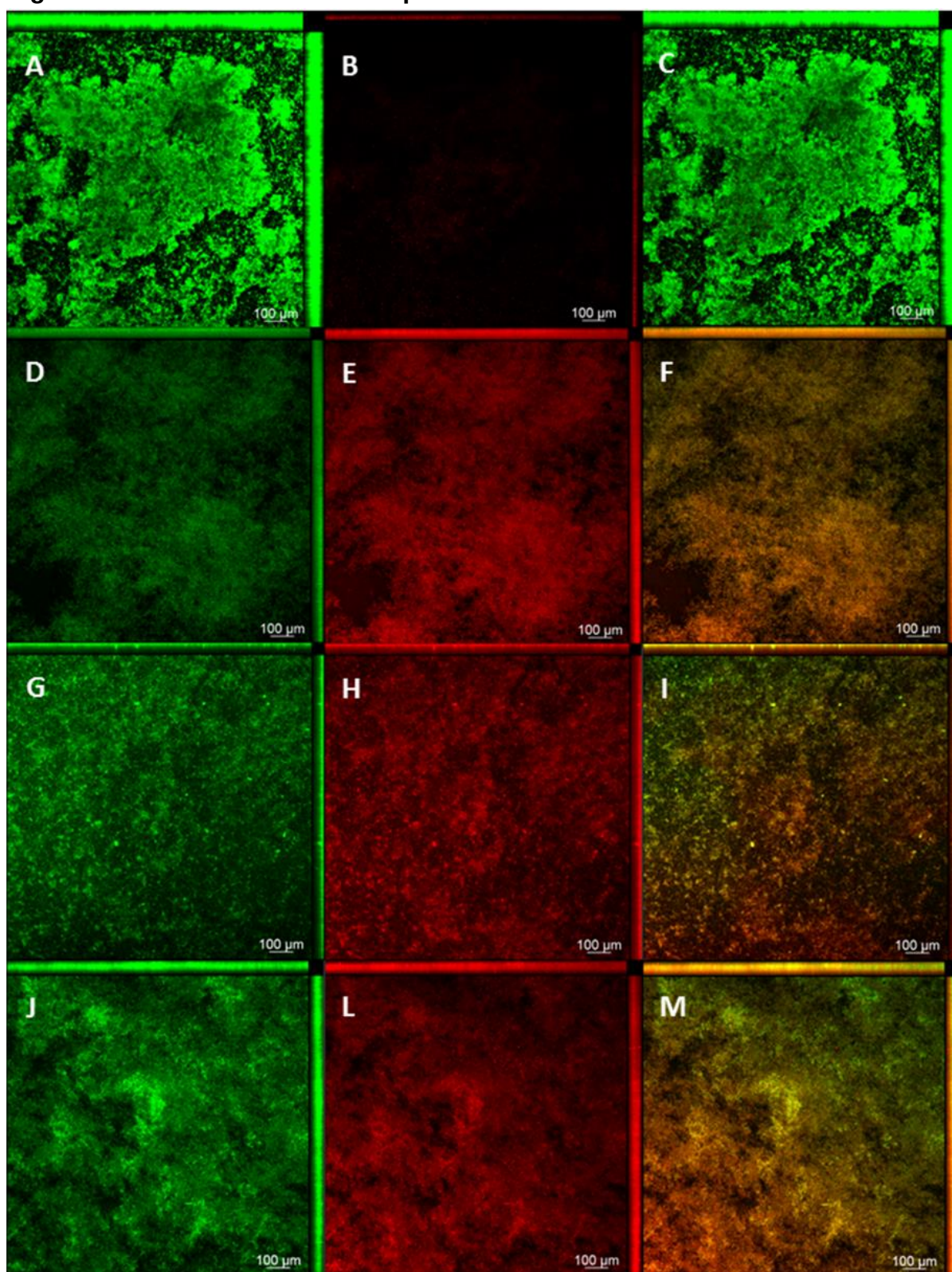
Estes ensaios revelaram que a TFDa foi eficaz ao afetar a estrutura desses biofilmes, reduzindo sua biomassa.

4.8. Avaliação da relação vivo/morto através da microscopia de fluorescência confocal.

As amostras de biofilme provenientes do 15º ciclo de indução de resistência à TFDa, foram submetidas a análise por microscopia de fluorescência confocal (CLSM). A fim de verificarmos de forma qualitativa a viabilidade celular das bactérias, por ser uma técnica adequada para o estudo de biofilmes vivos hidratados com preparações mínimas, para conservar a estrutura e organização dos espécimes que o compõe (Miquel guennoc et al., 2017).

As imagens foram realizadas na objetiva de aumento de 10X e comparadas a uma amostra de biofilme maduro (7 dias) sem tratamento. A espessura dos biofilmes variaram de 80 µm a 120 µm para o grupo controle sem tratamento; 47,5 µm a 57,5 µm para o grupo tratado com azul de metileno, 33 µm a 47,5 µm para o grupo tratado com clorina-e6 e 51 µm a 54 µm para os biofilmes tratados com curcumina. A Figura 38 mostra imagens representativas de cada biofilme corado com o kit LIVE/DEAD (verde para bactérias vivas e vermelho para bactérias mortas).

Figura 36– Biofilmes analisados por CLSM



Imagens realizadas em objetiva de aumento 10x, os grupos analisados foram: A-C controle sem tratamento; D-F grupo tratado com TFDa + azul de metileno; G-I grupo tratado TFDa + clorina-e6; J-M grupo tratado com TFDa +curcumina.

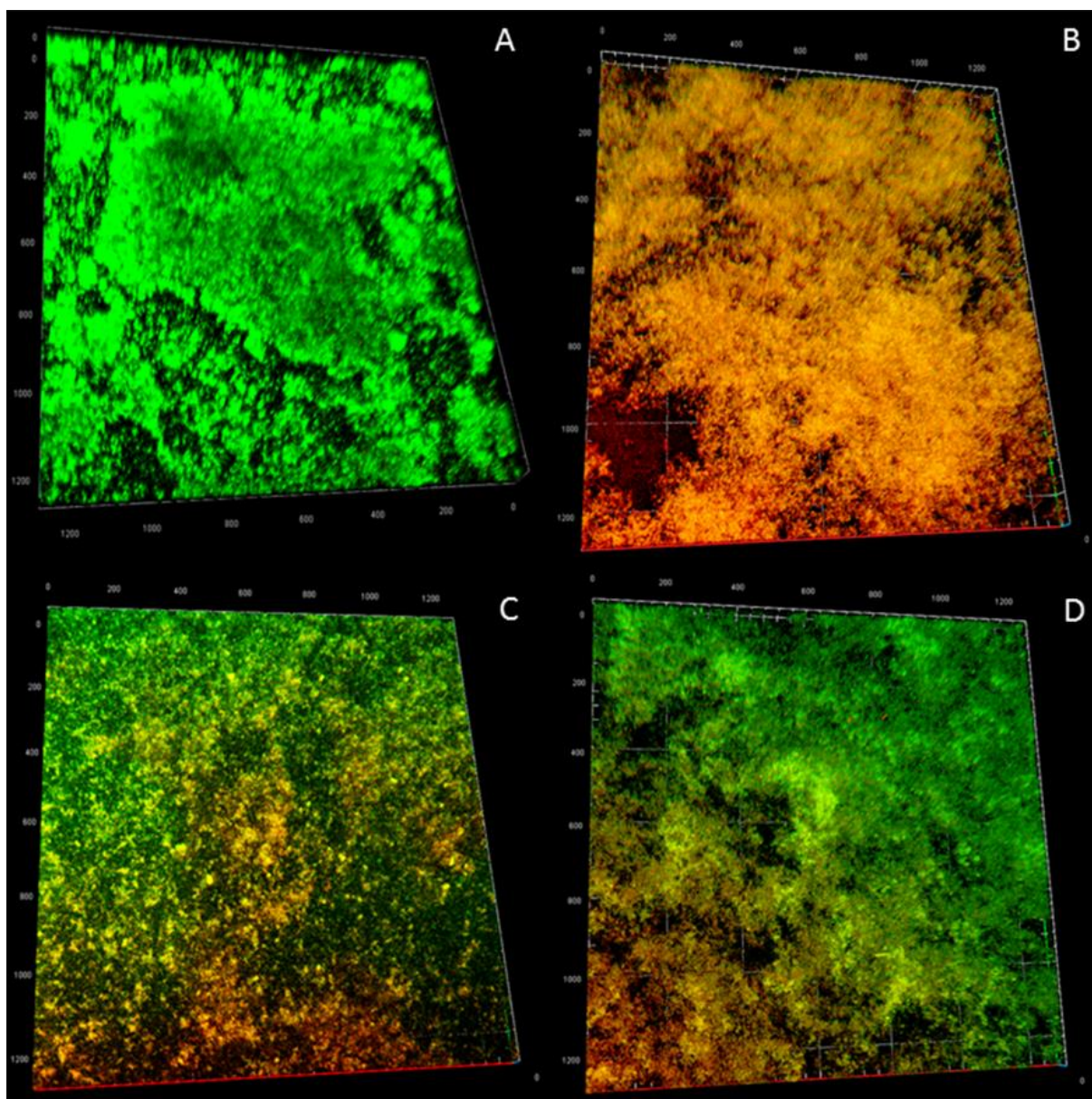
Os resultados apontaram que o biofilme não tratado é mais espesso e mantém uma elevada viabilidade celular, tendo marcação em verde em praticamente toda sua extensão. Por outro lado, de modo geral, as amostras de biofilme que passaram pelo 15° ciclo de TFDa, nos parâmetros sub ótimos anteriormente selecionados, apresentaram sua viabilidade celular comprometida, possuindo uma grande extensão do biofilme marcado pelo sinal vermelho e também não foram capazes de produzir/manter uma camada de células tão espessa como a que fora observada pelas células do grupo sem tratamento. Esse fenômeno pode ocorrer por conta de vários componentes da matriz poderem ser atacados por ROS. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *P. aeruginosa* e *E. faecalis* revelaram danos à arquitetura após a TFDa, baseada em azul de metileno (Garcez et al., 2011; Beirão et al., 2014).

A TFDa com 150 µg/mL de azul de metileno, associado a dose de luz de 150 J/cm², ao fim do 15° ciclo, resultou em uma diminuição de 3,95 log₁₀, apresentando aparentemente a maior quantidade de células mortas no biofilme. A clorina-e6 e curcumina apresentaram um resultado semelhante na marcação da viabilidade bacteriana, dado esse que pode ser comparado pela contagem de UFC/mL, com 2,68 log₁₀ de redução para clorina-e6 e 2,78 log₁₀ para curcumina.

As imagens geradas nos mostram de forma qualitativa a eficiência da TFDa mediada por esses FS.

A figura 39 revela os mesmos biofilmes analisados, porém sob a perspectiva 3D

FIGURA 39 – Biofilmes analisados por CLSM em perspectiva 3D



Imagens analisadas em objetiva de aumento 10x, os grupos analisados foram: A – controle sem tratamento; B – TFD+ azul de metileno; C – TFD + clorina-e6; D – TFD + curcumina.

4.9. Avaliação da internalização dos fotossensibilizadores

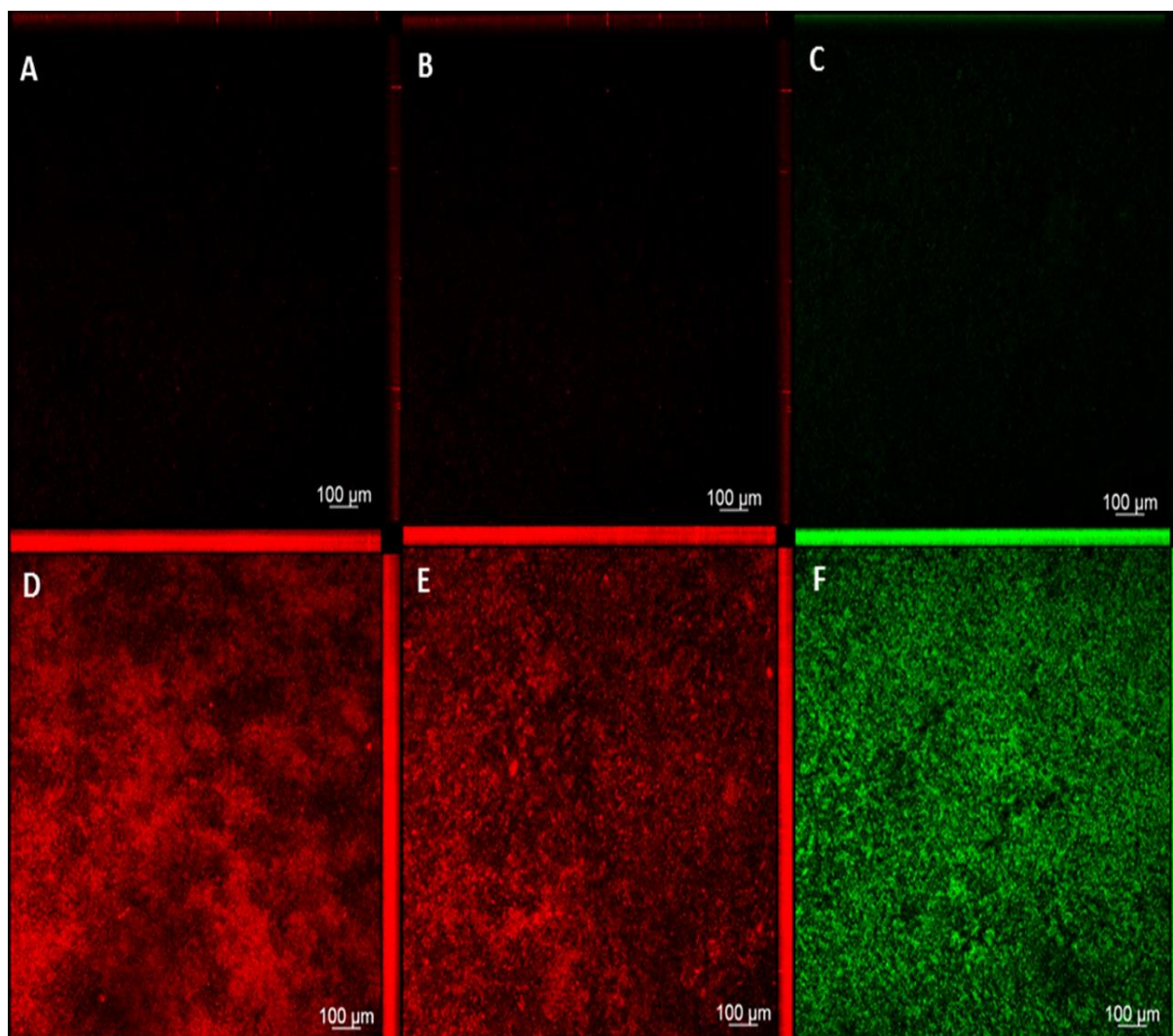
Além de serem facilmente permeáveis às células, os FS também devem ser capazes de se difundir nas camadas internas das substâncias poliméricas extracelulares do biofilme oral (Zijngel et al., 2012; Koo et al., 2013).

A internalização dos FS é de grande importância para que o efeito fotodinâmico tenha maior efetividade. Todavia, a matriz contendo polissacarídeos, proteínas, hexosamina, ácido urônico e DNA, é a primeira linha de defesa contra a maioria dos estresses ambientais, incluindo a TFDa, pois limita a difusão interna do FS, por exemplo: uma cepa de *S. aureus* produtora de lodo dificultou a captação de FS e mostrou menor sensibilidade a TFDa, do que cepas sem lodo (Gad et al., 2004). A penetração restrita pode fazer com que o tratamento seja ineficaz, favorecendo a prevalência de células persistentes. (Honraet, Rossel, Coenye, 2014).

Stewart (2003) afirma que os solutos difundidos para dentro e para fora do biofilme, através de canais de água, podem não atingir o interior dos aglomerados celulares, isso se deve a penetração retardada ou incompleta de um agente antimicrobiano, reagindo ou sendo absorvido pela biomassa nas camadas superficiais do biofilme, mais rapidamente do que se difunde no interior do mesmo. Dessa forma, é possível que os aglomerados celulares mais internos dos biofilmes utilizados nesse trabalho não tenham sido sensibilizados pelos FS, minimizando o efeito da TFDa.

A análise de CLSM revelou que os 3 FS empregados na aplicação da TFDa foram capazes de penetrar parcialmente o interior da camada do biofilme (Figura 40). Com a fluorescência do azul de metileno sendo detectada até uma profundidade de 57,5 µm, clorina-e6 atingindo detecção de fluorescência até 42 µm e a curcumina 42,5 µm. Em nosso estudo a TFDa, mediada por azul de metileno obteve o melhor índice de redução bacteriana no biofilme e também foi o FS com maior índice de penetração com 57,5 µm, indicando uma relação entre morte e penetração.

Figura 37– Internalização dos fotossensibilizadores no biofilme



Imagens realizadas em objetiva de aumento 10x. A= background laser 561 nm; B= background 561 nm; C= Background laser 488 nm; D= internalização azul de metileno; E= internalização clorina e6; F= internalização curcumina.

4.10. Checkerboard DNA-DNA Hybridization

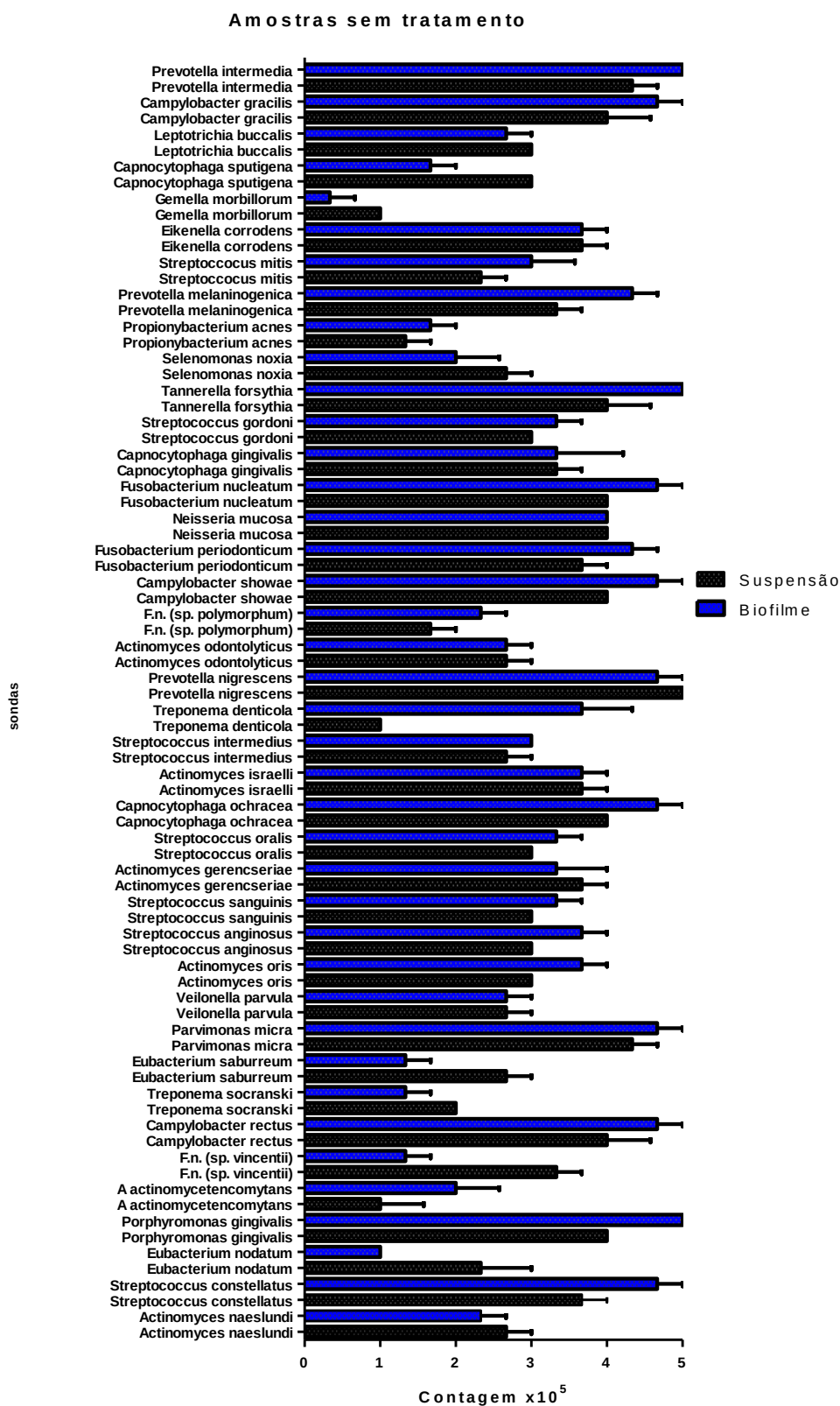
A avaliação da composição microbiológica das amostras coletadas, são mostradas nas figuras a seguir (41, 42, 43 e 44) de acordo com a média de contagem ($\times 10^5$) das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas analisadas.

Na figura 41 têm-se amostras na fase planctônica e em biofilme, ambas sem tratamento. Na figura 42: Planctônica 4º ciclo e biofilme 15º ciclo, tratados com azul de metileno. Na figura 43: Planctônica 4º ciclo e biofilme 15º ciclo, tratados com clorina e6. Na figura 44: Planctônica 2º ciclo e biofilme 15º ciclo, tratados com curcumina.

As amostras não tratadas em fase planctônicas e biofilme, apresentaram uma maior prevalência das bactérias que compõem o complexo vermelho (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*) e complexo laranja (*Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus* e *Campylobacter showae*), possuindo também uma distribuição homogênea em menor proporção entre os complexos verde, amarelo, roxo e azul, além de outras espécies componentes. Características essas, que mimetizam, de certa forma, a composição da flora microbiana, em condições clínicas de doença periodontal crônica.

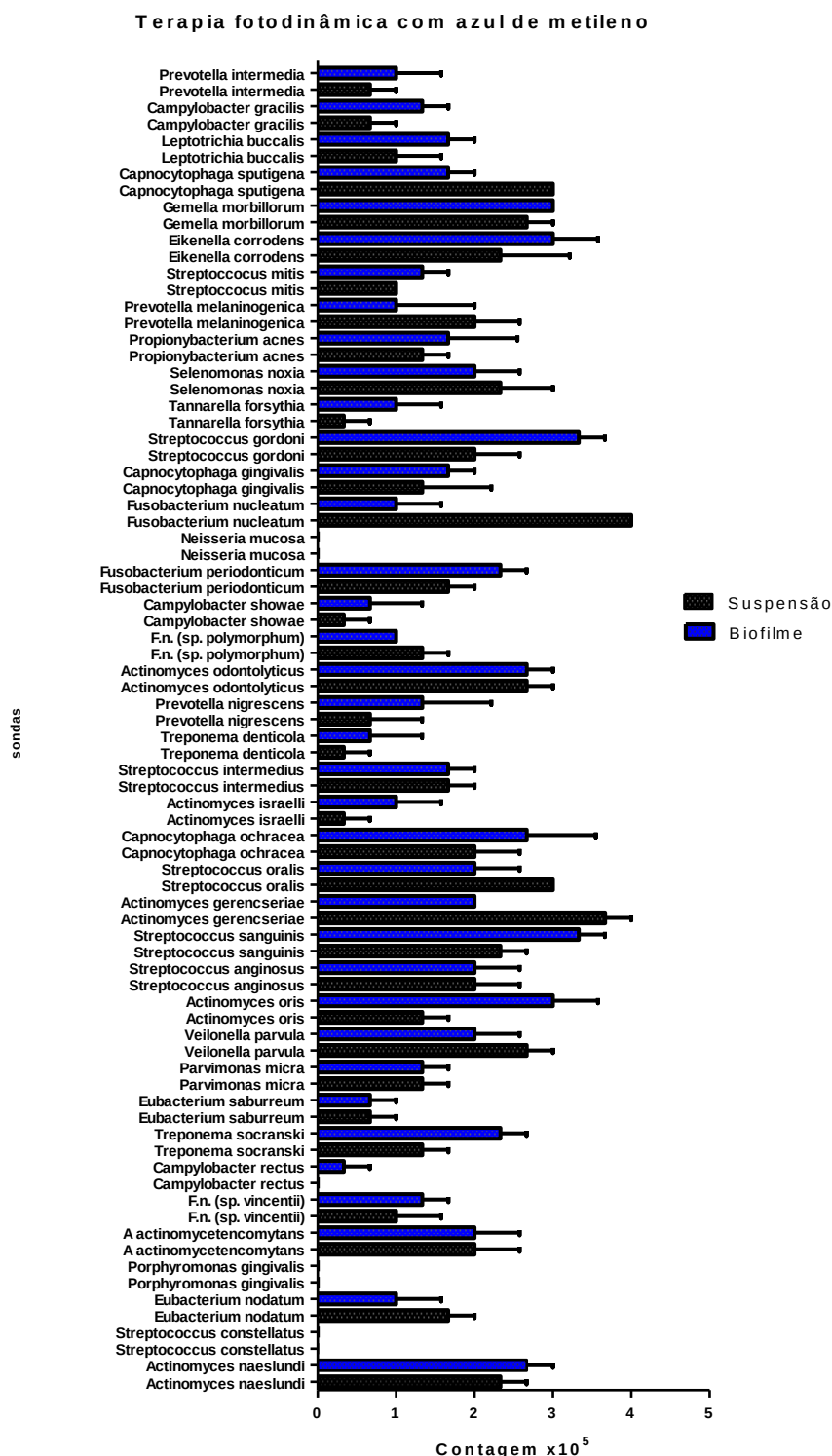
Com relação aos tratamentos com TFDa todas as amostras revelaram, tanto em biofilme como em fase planctônica, uma diminuição acentuada (* $p < 0,05$) das bactérias de todos os complexos, mas principalmente dos patógenos integrantes dos complexos vermelho e laranja, indicando uma possível melhora para a restauração de uma microbiota mais compatível com a saúde periodontal. Um resultado semelhante foi descrito por Cappuyns et al (2012), o qual observou um benefício adicional da TFDa, ao reduzir significativamente *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*. Ruhling et al (2010) verificou que as populações de: *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* foram acentuadamente reduzidas imediatamente após a administração da TFDa.

Figura 38- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, sem tratamento



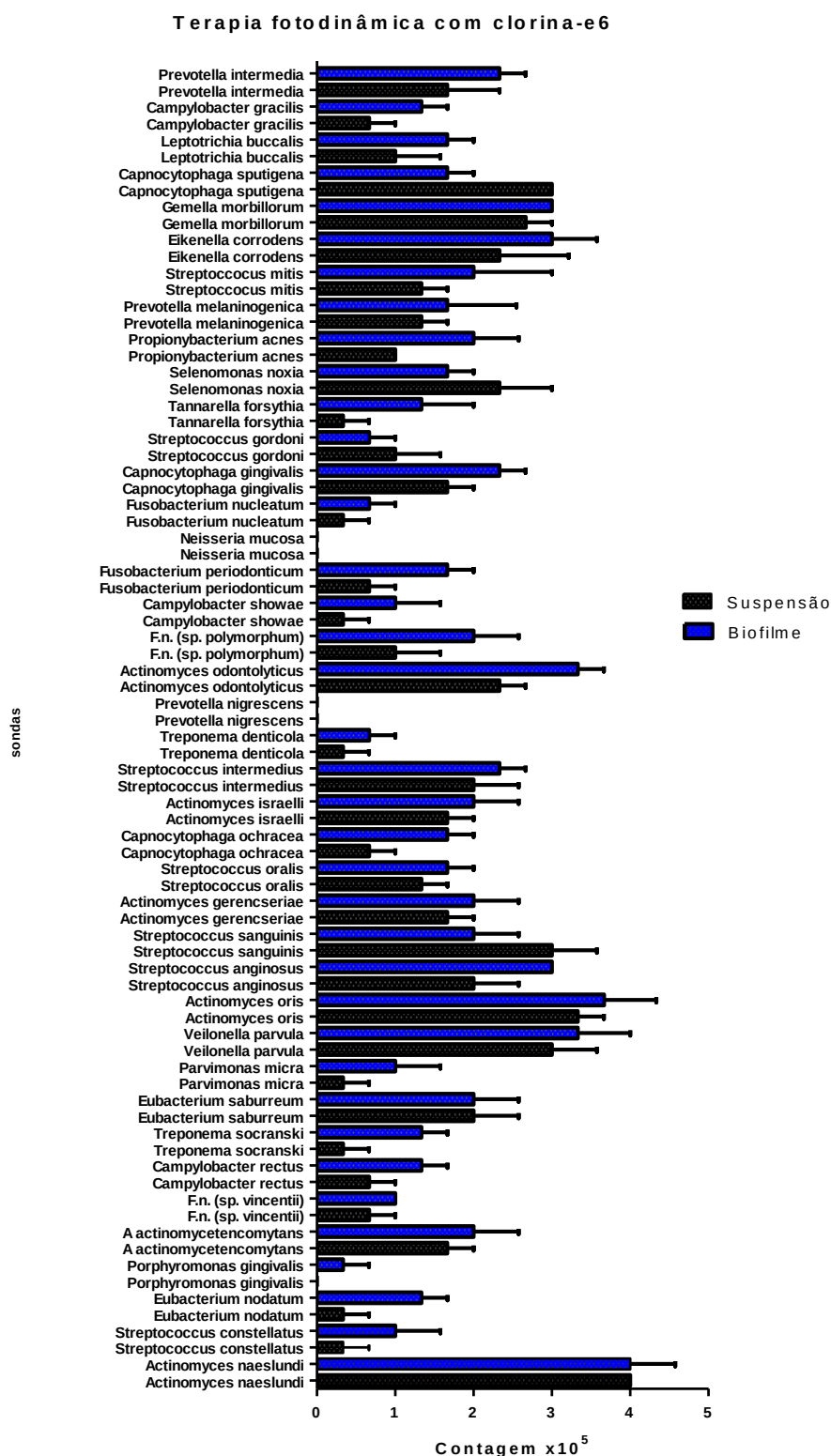
Perfis de contagens de DNA de 40 micro-organismos em amostras de placas dentárias (suspensões) e em biofilmes derivados de placas. Cada barra representa a contagem das sondas de DNA ($\times 10^5$ células). O eixo vertical mostra as espécies bacterianas.

Figura 39- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, azul de metileno



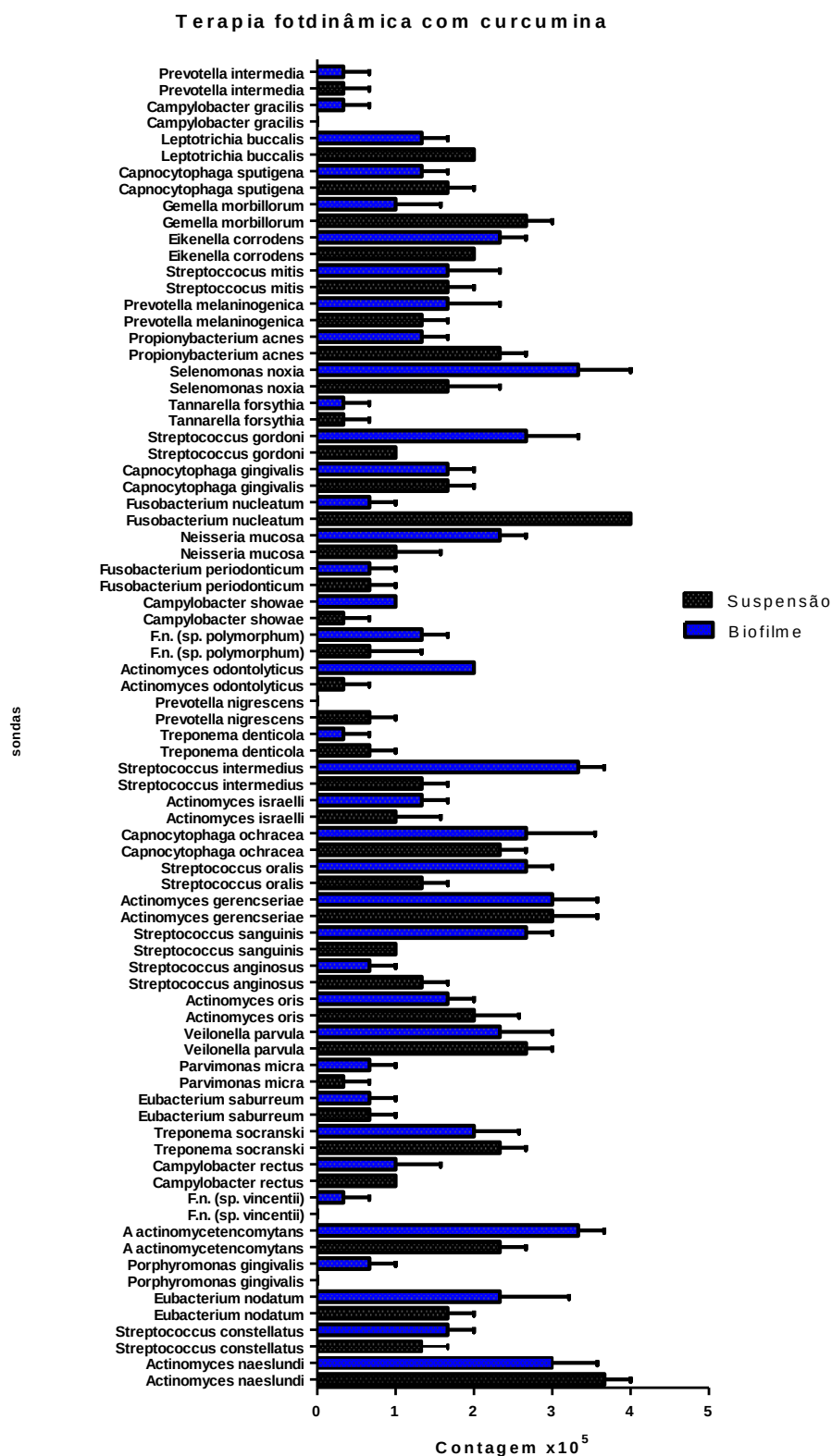
Perfis de contagens de DNA de 40 micro-organismos em amostras de placas dentárias (suspensões) e em biofilmes derivados de placas. Cada barra representa a contagem das sondas de DNA ($\times 10^5$ células). O eixo vertical mostra as espécies bacterianas.

Figura 40- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, clorina-e6



Perfis de contagens de DNA de 40 micro-organismos em amostras de placas dentárias (suspensões) e em biofilmes derivados de placas. Cada barra representa a contagem das sondas de DNA ($\times 10^5$ células). O eixo vertical mostra as espécies bacterianas.

Figura 41- Checkerboard DNA-DNA Hybridization, curcumina



Perfis de contagens de DNA de 40 micro-organismos em amostras de placas dentárias (suspensões) e em biofilmes derivados de placas. Cada barra representa a contagem das sondas de DNA ($\times 10^5$ células). O eixo vertical mostra as espécies bacterianas.

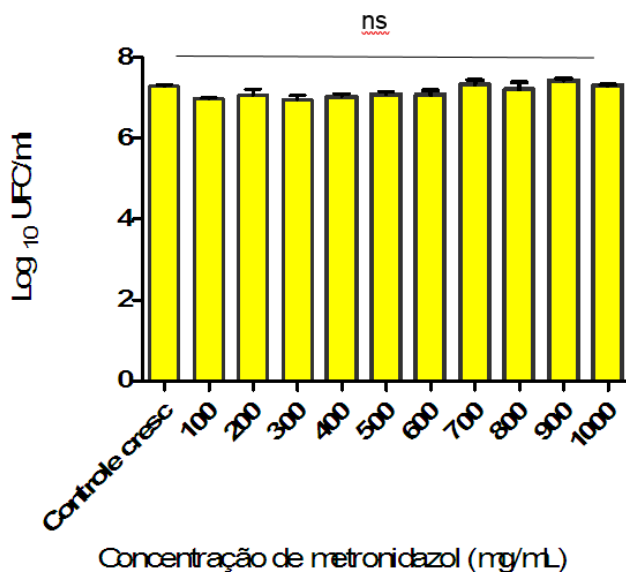
4.11. Teste de sensibilidade ao metronidazol

Na periodontia, o uso de antibiótico sistêmico tem o intuito de suprimir ou eliminar os patógenos do biofilme subgengival. Porém, nem todos os pacientes se beneficiam da terapia antimicrobiana por conta do surgimento de cepas resistentes, (Buchmann et al., 2010), como foi demonstrado por Thomas et al (2014), relatando que 74.2% dos 400 indivíduos com periodontite crônica avaliados, apresentaram resistência ao menos a um dos antibióticos testados em seu estudo (amoxicilina, clindamicina, doxiciclina e metronidazol). Winkelhof (2000) associou que provavelmente antibióticos sistêmicos no tratamento de infecções humanas poderiam influenciar na susceptibilidade das bactérias subgengivais. Seus resultados mostraram que as bactérias periodontais anaeróbias em pacientes com periodontite, apresentaram um nível significativamente mais alto de resistência a penicilina, amoxicilina, metronidazol, clindamicina e tetraciclina.

A amostra avaliada neste estudo se mostrou resistente ao metronidazol (Figura 45), com todas as dosagens clinicamente utilizadas para o tratamento da doença, não resultando em uma redução bacteriana significativa ($p < 0,05^*$). Este achado valoriza os resultados encontrados neste estudo, pois a TFDa foi capaz de reduzir de forma eficiente cepas resistentes ao metronidazol.

Similarmente a este resultado, um estudo recente realizado por Al-Mutairi et al (2018), em isolados clínicos de *E. coli* e *S. aureus* resistentes à antibióticos, também não se mostraram tolerantes à foto-inativação.

Figura 42– Teste de sensibilidade ao metronidazol



Valores médios de $\log_{10}$ entre os grupos controle de crescimento, e as concentrações de metronidazol testadas. As colunas representam os valores médios de $\log_{10}$ de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão (one-way ANOVA com pós teste de Tukey) ns: não significativo.

5. Conclusões

De forma geral e de acordo com as metodologias empregadas, pode-se concluir que a TFDa mediada por azul de metileno, clorina-e6 e curcumina apresentou potencial de redução total e parcial frente ao *pool* de bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e biofilme, respectivamente.

Também foi possível observar, em suspensão, que este mesmo *pool* de bactérias quando sujeito a consecutivas doses sub letais de TFDa, não desenvolveu o perfil de resistência, resultando na eliminação total da carga microbiana até o 5º ciclo para azul de metileno e clorina-e6 e 3º ciclo para curcumina.

Com as aplicações sucessivas de TFD em biofilme não se obteve a redução completa da microbiota, no entanto as aplicações sucessivas resultaram em um aumento gradativo da redução dessa carga bacteriana, indicando, portanto, que a TFDa não induziu resistência a esses micro-organismos. Adicionalmente, essas reduções proporcionadas pela TFDa, ocasionaram uma alteração na composição da microbiota oral, diminuindo a prevalência das bactérias do complexo vermelho e laranja.

Por fim, conclui-se também que mesmo em bactérias resistentes ao metronidazol, a TFDa foi eficiente. Evidenciando o potencial promissor desta terapia na prática clínica.

6. Referências bibliográficas

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- ACKROYD, R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- AKLOV, O. E. *et al.* Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. **Medical Laser Application**, v. 21, n. 4, p. 251-260, 2006.
- AL-AHMAD, A. *et al.* Photoinactivation Using Visible Light Plus Water-Filtered Infrared-A (vis+wIRA) and Chlorine e6 (Ce6) Eradicates Planktonic Periodontal Pathogens and Subgingival Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 594-601, 2016.
- ALLENSPACH-PERZILKA, G.D.; GUGGEIHEIN, B. Bacterial invasion of the periodontium: an important factor in the pathogenesis of periodontitis? **Journal Clinical Periodontol**, v. 10, n. 5, p. 609-617, 1983.
- AL-MUTAIRI, R. *et al.* Sublethal Photodynamic Treatment Does Not Lead to Development of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 17, p. 2796-2805, 2018.
- ALVARENGA, L. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 131-135, 2015.
- AMMOR, M. S. *et al.* Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 6-15, 2008.
- ARAKANE, K. *et al.* Singlet oxygen generation from coproporphyrin in Propionibacterium acnes on irradiation. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 223, n. 7, p. 578-582, 1996.
- ARAÚJO, N. *et al.* Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers in Medical Science**, v 29, n. 2, p. 629-635, 2013.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76, n. 2, p. 425-430, 2005.
- ÁVILA CAMPUS, M.J. *et al.* Specific primer for AP-PCR identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans. **Journal Clinical Periodontol**, v. 26, n. 11, p. 699-704, 1999.
- BALTACIOGLU, E. *et al.* Analysis of clinical results of systemic antimicrobials combined with nonsurgical periodontal treatment for generalized aggressive periodontitis: a pilot study. **Journal Canadian Dental Association**, v. 77, n. b97, p. 42-51, 2011.
- BEIRÃO, S. *et al.* Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 60, n. 6, p. 1387-1396, 2014.
- BRAHAM, P. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 11, p. 1790-1798, 2009.
- BROWN, MR.; ALLISON, DG.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect. **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 777-80, 1988.
- BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. Review The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment Photodynamic therapy. **The Lancet - Oncology**, v. 5, p. 497-508, 2004.

- BUCHMANN, R.; CONRAD, G.; SCULEAN, A. Short-term effects of systemic antibiotics during periodontal healing. **Quintessence International**, v. 41, n. 12, p. 303-12, 2010.
- CAPPUYNS, I. *et al.* A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 979-986, 2011.
- CASAS, A. *et al.* Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2486–2515, 2011.
- CASSIR, N.; ROLAIN, J.M.; BROUQUIL, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. October, p. 1–15, 2014.
- CHAN, Y.; LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 51–55, 2003.
- CHEN, D. *et al.* Light-Emitting Diode-Based Illumination System for In Vitro Photodynamic Therapy. **International Journal of Photoenergy**, v. 2012, n. 6, p. 1-6, 2012.
- CHEN, H. C. *et al.* Bacteriocidal and mutagenic effects of ozone on shrimp (*Penaeus monodon*) meat. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 923-927, 1992.
- CIEPLIK, F. *et al.* The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUN, 2015.
- COBB, CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. **Journal Clinical Periodontol**, v. 29, n. 2, p. 6-16, 2002.
- COSTERTON, JW.; STEWART, PS.; GREENBERG, EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p.1318-22, 1999.
- COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International journal of medical microbiology**: v. 303, n. 6-7, p. 287–92, 2013.
- CUGINI, M. A. *et al.* The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n.1, p. 30-36, 2000.
- DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections- State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 617, p. 170–188, 2009.
- DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**, v. 37, p. 883-87, 1992.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.
- DOMENECH, M. *et al.* Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2606-2615, 2013.
- DRIFFIELD, K. *et al.* Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n.5, p. 1053-1056, 2008.
- DRISKO, C. L. *et al.* Evaluation of Periodontal Treatments Using Controlled-Release Tetracycline Fibers: clinical response. **Journal of Periodontology**, v. 66, n. 8, p. 692-699, 1995.
- DRULIS-KAWA, Z. *et al.* The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inactivation with Fotolon (chlorine-e6). **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 305-310, 2005.

EMRICH, L. J.; SHLOSSMAN, M.; GENCO, R. J. Periodontal Disease in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 2, p. 123-131, 1991.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British Journal of Nutrition**, v. 26, n. 11, p. 1-13, 2010.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 25-64, 2014.

FERES, M. *et al.* Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 7, p. 597-609, 2001.

FIMPLE, J. L. *et al.* Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 6, p. 728-734, 2008.

FONTANA, C. R. *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009.

FRIEDRICH, C.L. *et al.* Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 44, p. 2086-2092, 2000.

GAD, F. *et al.* Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Grampositive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 48, p. 2173-2178, 2004.

GARCEZ, A. S. *et al.* Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. **Photochemistry and Photobiology**, v. 10, n. 4, p. 483-490, 2011.

GEORGE, S.; HAMBLIN, MR.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 8, n. 6, p. 788-95, 2009.

GIROLDO, L. M. *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 1, p.109-112, 2009.

GIULIANI, F. *et al.* In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637-42, 2010.

GOMES, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GOMES, S. G. *et al.* Periodontal status in smokers and never smokers: clinical findings and real time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 9, p. 1483-1490, 2006.

GOULART, R. *et al.* Photodynamic Therapy in Planktonic and Biofilm Cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. 53-60, 2010.

GUERRERO, A.; ECHEVERRIA, JJ.; TONETTI, MS. Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 10, p. 897-902, 2005.

HAFFAJEE, AD.; SOCRANSKY, SS.; GUNSOLLEY, JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. **Annals of Periodontology**, v. 8, n. 1, p. 115-181, 2003.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.

- HAUKVIK, T. *et al.* Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 2009.
- HERRERA, D. *et al.* Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 8, p. 45-66, 2008.
- HINRICHS, J. E. *et al.* Effects of scaling and root planning of subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 56, n. 4, p. 187-94, 1985.
- HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1663-74, 2010.
- HONRAET K.; ROSSEL B.; COENYE T. The acne biofilm. In: ZOUBOULIS, Christos C. *et al.* (Ed.). **Pathogenesis and treatment of acne and rosacea**. Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- HORVATH, P. *et al.* Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 4, p. 1401-1412, 2008.
- HUANG, L. *et al.* Photodynamic Inactivation of Bacteria Using Polyethylenimine–Chlorin(e6) Conjugates: Effect of Polymer Molecular Weight, Substitution Ratio of Chlorin(e6) and pH. **Lasers in surgery and medicine**, v.43, n.4, p. 313–323, 2011.
- JEFFERSON, K. K.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Use of Confocal Microscopy to Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through Staphylococcus aureus Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2467-2473, 2005.
- JETTE, A. M.; FELDMAN, H. A.; DOUGLASS, C. Oral disease and physical disability in community-dwelling older persons. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 41, n. 10, p. 1102- 1108, 1993.
- KAMMA, J.J.; BAEHNI, P.C. Five-year maintenance follow-up of early-onset periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 6, p. 562-72, 2003.
- KASHEF, N.; KARAMI, S.; DJAVID, G. E. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on Staphylococcus aureus biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 186–192, 2015.
- KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.
- KISHEN, A.; HAAPASALO, M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. **Endodontic Topics**, v. 22, n. 1, p. 58-78, 2010.
- KOMERIK, N. *et al.* In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.
- KONOPLA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v.86, n. 8, p. 694-707, 2007.
- KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 12, p. 1065-1073, 2013.
- Kyaw, C.M. Biofilmes Microbianos. Disponível em: www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm acesso em 12 de abril 2018.
- LIM, M.E. *et al.* Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1912–1920, 2012.
- LISTGARDEN, MA.; LINDHE, J.; HELLDEN, L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 5, n. 4, p. 246-71, 1978.

LOE, H. *et al.* Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13, n. 5, p. 431-440, 1986.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental Gingivitis in Man. **Journal of Periodontology**, v. 36, n. 3, p. 177-187, 1965.

LOESCHE, W. J.; KAZOR, C. Microbiology and treatment of halitosis. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 256-279, 2002.

LOESCHE, W. J. *et al.* Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 56, n. 8, p. 447-456, 1985.

MACHADO, A. E. DA. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n.3, p. 261-266, 1992.

Frade, L. M. Hidrogéis como sistema de liberação de fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*. 2018. 80f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Araraquara, 2018.

MATARAZZO, F. *et al.* Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo controlled study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 885-896, 2008.

MEIMANDI, M. *et al.* The Effect of Photodynamic Therapy in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Review of Literature. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8, p. S7-S11, 2017.

METCALF, D. *et al.* Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 190-192, 2006.

MIQUEL GUENNOC, C. *et al.* New Method for Qualitative Multi-scale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, v. 119, 2017.

MOFTAH, N. H.; IBRAHIM, S. M.; WAHBA, N. H. Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 4, p. 263-268, 2016.

MOORE, W. E.; MOORE, L. V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, n. 1, p. 66-77, 1994.

MOREIRA, R.; FERES, E. J. Comparison between full-mouth scaling and root planning and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 9, p. 1683-1688, 2007.

MROZ, P. *et al.* Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 7, n. 1, p. 75-91, 2011.

MÜLLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P.R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, n. 1, p. 77-80, 2007.

NAJAFI, S. *et al.* An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effects of Curcumin-Based Photodynamic Therapy and Chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 21–25, 2016.

NEMEZIO, M. *et al.* Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 234–237, 2017.

NITZAN, Y. *et al.* Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 86–89, 1992.

NYMAN, S. *et al.* New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 9, n. 4, p. 290–296, 1982.

O'NEILL, JF.; HOPE, C.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 86–90, 2002.

OGURA, M. *et al.* Photomechanical wave-assisted molecular delivery in oral biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 1637–1646, 2007.

PAGE, R. C. *et al.* Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 216–248, 1997.

PELOI, L.S. Estudos da aplicação do corante azul de metileno em Terapia Fotodinâmica. 2007. 67f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2007.

PENNEL, B. M.; KEAGLE, J. G. Predisposing Factors in the Etiology of Chronic Inflammatory Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 48, n. 9, p. 517–532, 1977.

PFITZNER, A. *et al.* Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. **Journal of Periodontology**, 2004, v. 75, n. 10, p. 1343–1349, 2004.

PURUCKER, P. *et al.* Local versus systemic adjunctive antibiotic therapy in 28 patients with generalized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 9, p. 1241–1245, 2001.

QIN, Y. L. *et al.* Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 43, n. 2, p. 162–167, 2008.

RAWLINSON, A.; DUERDEN, B. I.; GOODWIN, L. New findings on the microbial flora associated with adult periodontitis. **Journal Dental Research**, v. 21, n. 3, p. 179–184, 1993.

RIBEIRO, M. S. *et al.* Laser em Baixa Intensidade. In: **Técnicas e Procedimentos Terapêuticos**. [s.l.: s.n.], p. 945–953.

ROSENBERG, E.S.; EVIAN, C. L.; LISTGARTEN, M. A. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, v. 52, n. 8, p. 435–441, 1981.

RUMJANEK, N.; FONSECA, M. C. C. DA.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. n.33, p.34–49, 2004.

Sabino, C. P. *et al.* The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 72–78, 2016.

Annunzio, S.R. Atividade antimicrobiana sinérgica da terapia fotodinâmica e tetraciclina contra *Propionibacterium acnes*. 2017.82f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2018.

SGOLASTRA, F. *et al.* Effectiveness of periodontal treatment to improve metabolic control in patients with chronic periodontitis and type 2 Diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 7, p. 958–973, 2013.

SIGUSCH, B. W. *et al.* Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 7, p. 1100-1105, 2005.

SIMONSON, L. G. *et al.* Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in a multinational population. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 7, n. 2, p. 111–112, 1992.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. **Periodontology 2000**, v. 20, n. 1, p. 7–13, 1999.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. **Compendium Supplement**, v. 18, n. S684-5, p. 688-693, 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic target. **Periodontol 2000**, v. 28, n. 1, p. 12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v.38, n. 1, p.135-187, 2005.

SOCRANSKY, S. S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **Journal Dental Research**, v. 49, n. 2, p. 203-222, 1970.

SØRENSEN, S. J. *et al.* Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, 700-710, 2005.

SOUKOS, N. S. *et al.* Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

SOUKOS, N. S. *et al.* Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 161-168, 2003.

SOUZA, L. C. *et al.* Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/ irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 292-296, 2010.

SREEDHAR, A. *et al.* Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, p. s102-s109, 2015.

DENIS, S. T.*et al.* All you need is light. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509-520, 2011.

TANNER, A. C. R. *et al.* *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 213–221, 1986.

TARASZKIEWICZ, A. *et al.* Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

TARDIVO, J. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TAVARES, A. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, 91-105, 2010.

The American Academy of Periodontology 1996 ANNUAL REPORT. **Journal of Periodontology**, v. 67, n. 12, p. 1349–1364, 1996.

TREMBLAY, Y. D. *et al.* The bacterian biofilms - their importance in animal health and in public health. **Canadian journal of veterinary research**, v. 78, n. 2, p. 110-116, 2014.

ULIANA, M. P. *et al.* Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 13, n. 8, p. 1137–45, 2014.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 71, n. 1, p. 87-98, 2003.

VAN WINKELHOFF, A. J. *et al.* Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 2, p. 79–86, 2000.

WICHITNITHAD, W. *et al.* Effects of Different Carboxylic Ester Spacers on Chemical Stability, Release Characteristics, and Anticancer Activity of Mono-PEGylated Curcumin Conjugates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, p. 5206–5218, 2011.

WILLIAMS, J. A. *et al.* The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. **Caries**, v. 38, n. 6, p. 530–536, 2004.

WILLIAMS, J. A. *et al.* The Effect of Variable Energy Input from a Novel Light Source on the Photoactivated Bactericidal Action of Toluidine Blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries**, v. 37, n. 3, p. 190-193, 2003.

WILSON, C. *et al.* A putative serine/threonine protein kinase gene on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 8, n. 1, p. 71–77, 1992.

WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 8, n. 3, p. 182–187, 1993.

WOOD, S. *et al.* An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 1999.

World Health Organization. Antimicrobial resistance. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. acesso em 24 de fevereiro 2017.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA, J. R. A Terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal. **Perionews**, v. 1, n. 1, p. 79-85, 2007.

ZHANG, Y. *et al.* Antimicrobial Blue Light Therapy for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection in a Mouse Burn Model: Implications for Prophylaxis and Treatment of Combat-related Wound Infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 12, p. 1963–1971, 2013.

ZIJNGE, V. *et al.* Subgingival biofilm structure. **Frontiers of Oral Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2012.

7. Anexos

Anexo A

Aprovação comitê de ética em pesquisa

Título da Pesquisa: Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica.

Pesquisador Responsável: Lucas Henrique de Paula Zago

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 57957716.0.0000.5426

Submetido em: 19/04/2017

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_867186

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu.....RG...
 Estado Civil....., Idade.....
 anos, Residente na
 n°.....Bairro....., Cidade.....
 Telefone.....

Declaro ter sido convidado a participar da pesquisa e esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade avaliar a redução e resistência bacteriana dos micro-organismos causadores da doença periodontal (doença ao redor do dente) frente à terapia com utilização de luz;
2. Ao participar desse trabalho o doador estará colaborando para que a equipe científica possa investigar uma abordagem coadjuvante (que ajuda, atua junto, que complementa, que adiciona, que se soma ao tratamento convencional) para o tratamento da doença periodontal (doença ao redor do dente) e o potencial de resistência das bactérias causadoras da doença a essa técnica;
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, o (s) seguintes (s) material (ais) biológico (s) (amostras subgengivais de placa bacteriana – biofilme dental-coletado com auxílio de instrumentos odontológicos de raspagem) que será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
4. A minha participação como voluntário terá duração de 5 minutos e a coleta da amostra é um procedimento que já faz parte do tratamento;
5. **Riscos e desconforto:** O procedimento implica na possibilidade de desconforto e riscos moderados, tal como, o participante do projeto

apresentar como resposta ao tradicional procedimento de raspagem e alisamento da raiz do dente, um deslocamento da gengiva com exposição de uma parte da raiz do dente e sensibilidade dentinária temporária. Desta forma, o pesquisador prestará assistência integral ao participante do projeto sempre que for solicitado e/ou necessário. Nenhum dos procedimentos usados oferecem riscos à dignidade do participante;

6. A amostra será coletada uma única vez, pelos alunos de Pós Graduação em Periodontia desta faculdade, acompanhados pelos professores responsáveis da clínica de Periodontia;
7. Não será cobrado nenhum valor, bem como também não haverá nenhuma despesa ao participar desse estudo;
8. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim minha **privacidade** e se desejar, serei informado sobre os resultados dessa pesquisa pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP;
9. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
10. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização (isto é, sem interrupção do meu tratamento, quando for o caso)
11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone (16) 997038082 (Lucas Zago) e (16) 3301 57 27 (Prof. Dra. Carla R Fontana);
12. Para a notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0xx16) 3301-6897;

13. Trata-se de um documento emitido em duas vias, sendo uma para o voluntário e outra para o pesquisador;

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntário (a), do estudo “Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica”.

Assinatura do Voluntário (a)

Assinatura do Pesquisador

Araraquara,.....

DECLARAÇÃO

Eu, Lucas Henrique de Paula Zago, pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa “Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica”, declaro que todas as informações ao sujeito da pesquisa serão fornecidas por mim ou pela minha equipe momento da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura