

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/12/2020.

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 curcumina 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 subgingival, 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 subgingival, 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 conseqüente 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 à 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; Listgarden 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.

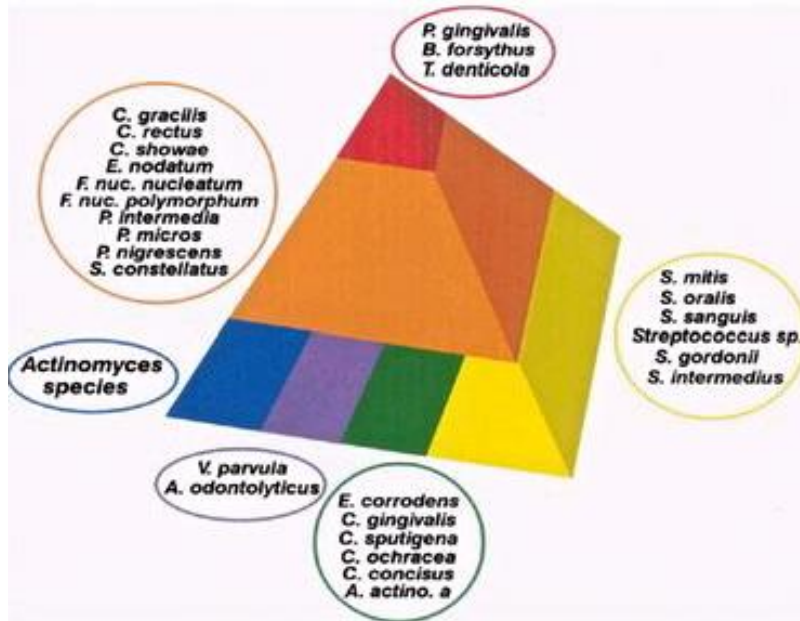
Socransky et al (1998), por meio desta técnica, analisaram associações entre 40 espécies de micro-organismos presentes no biofilme subgengival de 160 indivíduos portadores da doença periodontal, e suas relações com os parâmetros clínicos de inflamação. Os pesquisadores identificaram a existência de cinco 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*, *Campilobacter 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 subgingival 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 actinomycetemcomytans* 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 subgingival 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 (Pelo, 2007).

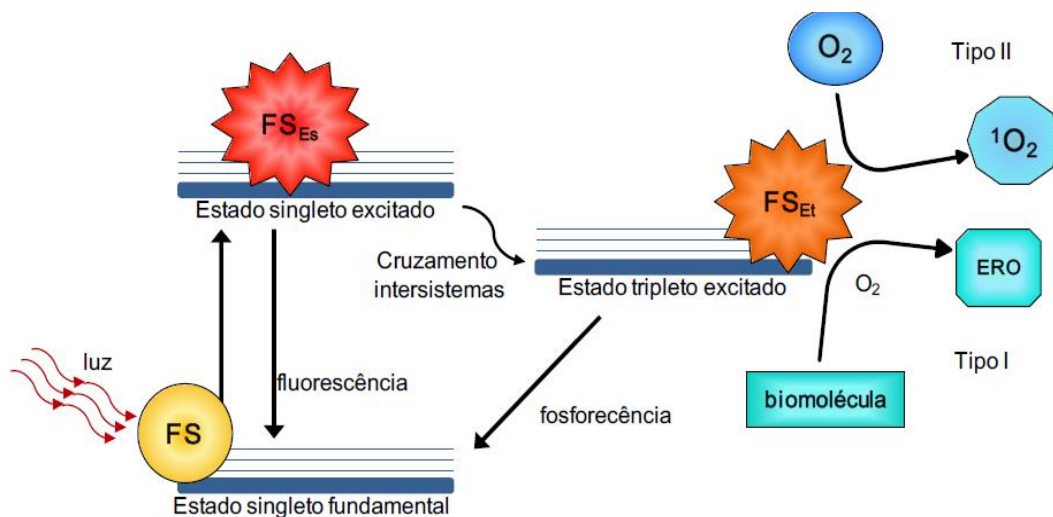
Enquanto a “ação fotodinâmica” em lesões cancerosas e/ou pré-cancerosas, juntamente com doenças não infecciosas como vitiligo, psoríase e degeneração da macula se desenvolvia, a TFD aplicada no campo das doenças infecciosas foi deixada de lado devido a descoberta dos antibióticos na década de 1940, o 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 subgingivais (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 (1O_2) e radicais livres como radical hidroxila (HO^{\bullet}) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). 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 procaríotas as reações da TFD se dão em sítios como, parede celular, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. (Komerik et al., 2003; Giroldo 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

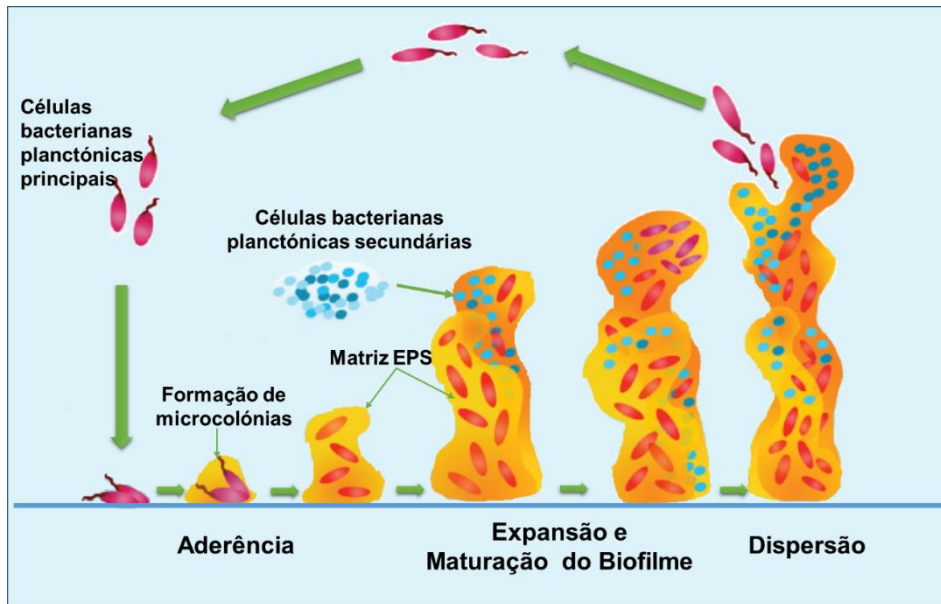
relação de seletividade e preservando a integridade das células hospedeiras (Malik et al., 1992; Nitzan et al., 1992).

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; Taraszkievicz, 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, Goldman 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 O_2^- 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.

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.; CONRADS, 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 GUENNOG, 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. 241-245, 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.