UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-BIOFOTÔNICA

ANA CAROLINA ALVES CAMARGO TORTAMANO

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O (BuTBO) PARA INATIVAÇÃO DE BIOFILME DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM DENTES BOVINOS

São Paulo, SP

2024

ANA CAROLINA ALVES CAMARGO TORTAMANO

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O (BuTBO) PARA INATIVAÇÃO DE BIOFILME DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM DENTES BOVINOS

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Medicina – Biofotônica

Orientador Prof.: Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Tortamano, Ana Carolina Alves Camargo.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com butil azul de toluidina O (butbo) para inativação de biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em dentes bovinos. / Ana Carolina Alves Camargo Tortamano. 2024.

49 f.

Tese (Doutorado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2. Butil azul de toluidina O. 3. *A. actinomycetemcomitans*. 4. Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT).
I. Prates, Renato Araujo. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 29 de outubro 2024

São Paulo, 29 de outubro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Ana Carolina Alves Camargo Tortamano

Título da Tese: “Terapia fotodinâmica antimicrobiana com butil azul de toluidina O (BuTBO) para inativação de biofilme de aggregatibacter actinomycetemcomitans em dentes bovinos”.

Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES_____

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS_____

Membro: PROFª. DRª. ALESSANDRA BAPTISTA_____

Membro: PROFª. DRª. LARA JANSISKI MOTTA_____

Membro: PROFª. DRª. PATRÍCIA APARECIDA DA ANA_____

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Ao meu orientador e amigo Professor Renato Araujo Prates por me orientar, ajudar, incentivar e dar todo auxílio necessário para a elaboração do projeto.

Aos alunos de iniciação cientifica por colaborarem nos experimentos, principalmente a aluna Valherya S. Rodriguez.

Aos colegas que contribuíram direta ou indiretamente neste projeto.

Ao meu colega Claudio Teruo Kassa por colaborar, motivar e contribuir em todo o processo de desenvolvimento.

A Universidade Nove de Julho pela oportunidade de realizar a segunda pós-graduação na instituição e a todos os professores que fizeram parte desta caminhada.

Ao CNPQ pela bolsa de produtividade do professor Renato Araujo Prates.

Á UFABC “FAPESP 2017/20989-9”.

RESUMO

Como intervenção adjuvante ao tratamento periodontal mecânico, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) busca induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, reduzindo a infecção microbiana. O butil azul de toluidina O, um fotossensibilizador da família das fenotiazinas recentemente desenvolvido, apresenta modificações físico-químicas na estrutura do azul de toluidina O, o que diminui a agregação e aumenta a produção de oxigênio singlete. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia do butil azul de toluidina O na eliminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em diferentes tempos de irradiação. Para isso, um biofilme foi cultivado em amostras dentárias bovinas, seguido pela aplicação da aPDT. Foram realizadas análises microbiológicas e por microscopia eletrônica de varredura. O experimento foi estruturado em um grupo denominado BuTBO, subdividido em seis subgrupos: grupo controle; grupo laser; grupo fotossensibilizador (com tempo de pré-irradiação de 1 minuto); e os grupos PDT, com diferentes tempos de irradiação (1, 3 e 5 minutos). Foi utilizado um laser com comprimento de onda de 660 nm e irradiância de 250 mW/cm², gerando energias de 6, 18 e 30 J para tempos de exposição de 60, 180 e 300 segundos, respectivamente, e exposições radiantes de 15, 45 e 75 J/cm². Após os procedimentos, as amostras foram cultivadas em condições microaerofílicas, quantificadas e convertidas em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para análise comparativa. Os resultados indicaram que a aplicação do BuTBO, com tempo de pré-irradiação e irradiação de 1 minuto, não resultou em diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Entretanto, com tempos de irradiação de 3 e 5 minutos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). A irradiação de 5 minutos resultou em uma redução microbiana de 99,99% no biofilme. Concluímos que o BuTBO demonstra potencial como fotossensibilizador para reduzir cargas microbianas de *A. actinomycetemcomitans*.

Palavra–chave: Terapia fotodinâmica antimicrobiana, Butil azul de toluidina O, *A. actinomycetemcomitans*, Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)

ABSTRACT

As an adjunct intervention to mechanical periodontal treatment, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) aims to induce the production of reactive oxygen species, thereby reducing microbial infection. Butyl toluidine blue O, a photosensitizer recently developed from the phenothiazine family, presents physical-chemical modifications to the structure of toluidine blue O, resulting in decreased aggregation and increased singlet oxygen production. The objective of this study was to investigate the efficacy of butyl toluidine blue O in eliminating *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, using a pre-irradiation time of 1 minute. To achieve this, a biofilm was cultured on bovine dental samples, followed by the application of aPDT. Microbiological evaluations and scanning electron microscopy analyses were performed. The experiment was structured into a group called BuTBO, which was subdivided into six subgroups: control group, laser group, photosensitizer group (corresponding to a pre-irradiation time of 1 minute), and PDT groups with different irradiation times (1, 3, and 5 minutes). A laser with a wavelength of 660 nm and an irradiance of 250 mW/cm² was used, generating energies of 6, 18, and 30 J for exposure times of 60, 180, and 300 seconds, respectively, and radiant exposures of 15, 45, and 75 J/cm². After the procedures, the samples were cultured under microaerophilic conditions, counted, and converted into colony-forming units per milliliter (CFU/mL) for comparative analysis. The results indicated that the application of BuTBO with pre-irradiation time and irradiation time of 1 minute did not show a statistically significant difference ($p > 0.05$). However, with irradiation times of 3 and 5 minutes, a statistically significant difference was observed ($p < 0.01$). Irradiation for 5 minutes resulted in a 99.99% microbial reduction in the biofilm. We conclude that BuTBO shows potential as a photosensitizer for reducing *A. actinomycetemcomitans* microbial loads.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy, Toluidine blue butyl O, *A. actinomycetemcomitans.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 A IMAGEM ILUSTRATIVA MOSTRA AS CONDIÇÕES DO PERIODONTO DE PROTEÇÃO E SUSTENTAÇÃO EM DOIS ESTÁGIOS: GENGIVITE, APRESENTANDO INFLAMAÇÃO DA GENGIVA, SEM COMPROMETIMENTO DO PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO (LIGAMENTO PERIODONTAL E OSSO ALVEOLAR PERMANECEM INTACTOS) E PERIODONTITE, ONDE A INFLAMAÇÃO AVANÇA, CAUSANDO A PERDA DE INSERÇÃO PERIODONTAL E REABSORÇÃO ÓSSEA, RESULTANDO EM DANOS AO PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO..... 11

FIGURA 2 IMAGEM ILUSTRATIVA DA PELÍCULA ADQUIRIDA E ADESÃO DAS COLONIZADORAS PRIMÁRIAS 13

FIGURA 3 IMAGEM ILUSTRATIVA DA FORMAÇÃO DO BIOFILME MADURO 13

FIGURA 4 REPRESENTAÇÃO DO DIAGRAMA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MICRO-ORGANISMOS EM AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL DESCRITO POR SOCRANSKY ET AL., 1998 14

FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO DO DIAGRAMA DE JABLONSKI, O QUAL CONTÉM TODOS OS PROCESSOS QUE VÃO ACONTECER DESDE A ABSORÇÃO DE LUZ ATÉ INICIAR A RESPOSTA BIOLÓGICA 18

FIGURA 6 DEMONSTRAÇÃO CLÍNICA DA APDT NAS BOLSAS PERIODONTAIS PARA TRATAMENTO COMPLEMENTAR AOS PROCEDIMENTOS BÁSICOS DA DOENÇA PERIODONTAL 19

FIGURA 7 ESTRUTURA MOLECULAR DO FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE METILENO (M. WAINWRIGHT ET AL;2016)..... 20

FIGURA 8 ESTRUTURA MOLECULAR DO FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE TOLUIDINA (M. WAINWRIGHT ET AL;2016)..... 21

FIGURA 9 GRÁFICO REPRESENTADO O ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO AZUL DE METILENO. AS SETAS VERMELHAS REPRESENTAM OS PICOS DE ABSORÇÃO NO ESTADO DE MONÔMERO (660NM) E DÍMERO (610 NM). TAO ET.AL., 2014 22

FIGURA 10 ESTRUTURA MOLECULAR DO FOTOSSENSIBILIZADOR BUTBO (M. WAINWRIGHT ET AL;2016)..... 23

FIGURA 11 ABSORÇÃO AQUOSA VISÍVEL POR ATO (PRETO) E BUTBO (TRAÇOS CINZAS), MOSTRANDO VARIAÇÃO NA AGREGAÇÃO, MENOR COMPRIMENTO DE ONDA, OMBRO (CONCENTRAÇÃO FOTOANTIMICROBIANA APROX. 15 MM)..... 24

FIGURA 12 IMAGEM ILUSTRATIVA DO AUMENTO DO VOLUME MOLECULAR ASSIMÉTRICO DEVIDO A 2-TERT-SUBSTITUIÇÃO DO GRUPO BUTILA (BUTBO) (B) EM COMPARAÇÃO AO ATO (A) (ESTRUTURAS COM ENERGIA MINIMIZADA USANDO O SOFTWARE CHEMDRAW 3D) [--] WAINWRIGHT ET AL;2016)..... 28

FIGURA 13 IMAGEM ILUSTRATIVA DAS AMOSTRAS BOVINAS CORTADAS EM 2 X 4 MM. 28

FIGURA 14 FLUXOGRAMA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS 30

FIGURA 15 IMAGEM ILUSTRATIVA DAS AMOSTRAS LAVADAS EM PBS..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosimetria da fonte de luz laser que foi utilizada nos experimentos. 29

LISTA DE ABREVIATURAS

A. a	*A. actinomycetencomitans*
aPDT	Antimicrobial photodynamic therapy
ATCC	Coleção de microorganismos Norte americana
ATO	Azul de toluidina O
BHI	Brain heart infusion
BuATO	Butil azul de toluidina O
BuTBO	Butil toluidine blue O
AM	Azul de metileno
C	Grupo controle
CO_2	Dióxido de carbono
DP	Doença periodontal
FNT-α	Fator de necrose tumoral alfa
FS	Fotossensibilizador
IL -6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
L	Grupo Laser
LED	Diodo emissor de luz
MB	Azul de metileno
O_2	Oxigênio
^oC	Graus celsius
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDT	Teradia fotodinâmica
P.g	*Porphyromonas gingivalis*
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
RNO	Molécula ρ-dimetilamina
ROS	Oxigen-reactive species
S_0	Excitado singlete fundamental
S_1	Estado excitado singlete
T_1	Estado tripleto
T.d	*Treponema denticola*
T.f	*Tannerella forsythia*
UFABC	Universidade federal do ABC
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO 11

1.1 DOENÇA PERIODONTAL 11
1.2 ANTIBIÓTICOTERAPIA SISTÊMICA 15
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA 17
1.4 FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZINAS 20
1.5 BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O 23

2. OBJETIVO 26

2.1 OBJETIVOS GERAIS: 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 26

3. METODOLOGIA 27

3.1 CONFECÇÃO DA SUSPENÇÃO MICROBIANA 27
3.2 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS BOVINAS 27
3.3 PREPARO DO FOTOSSENSIBILIZADOR 28
3.4 FONTE DE IRRADIAÇÃO 28
3.5 CRESCIMENTO DO BIOFILME MICROBIANO NAS AMOSTRAS DENTAIS 29
3.6 GRUPOS AMOSTRAIS 29
3.7 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) 30
3.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA 33
3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 33
3.10 ANÁLISE ESTATISTICA 34

4. RESULTADOS 35

DISCUSSÃO 38

CONCLUSÃO 41

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS 42

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 DOENÇA PERIODONTAL

Antes de se definir o conceito de doença periodontal (DP), é imperativo compreender o que se entende por saúde periodontal. Esta última é caracterizada pela ausência de processos inflamatórios clinicamente evidentes, bem como pela presença de profundidade de sondagem clínica de até 3 mm. A saúde gengival pode ser observada tanto em periodontos íntegros quanto reduzidos. No caso de um periodonto íntegro, os achados clínicos incluem profundidade de sondagem de até 3 mm, sangramento à sondagem em até 10% dos sítios, e ausência de perda de inserção e perda óssea radiográfica. Por outro lado, na saúde do periodonto reduzido, é possível identificar sangramento à sondagem também em até 10% dos sítios, perda de inserção e perda óssea radiográfica, que podem resultar de recessão gengival, intervenções cirúrgicas para aumento da coroa, ou em pacientes com histórico de periodontite que se encontram atualmente estáveis periodontalmente (1–3).

No espectro das doenças periodontais, destacam-se a gengivite e a periodontite. A gengivite afeta exclusivamente o periodonto de proteção e é considerada uma condição reversível; a remoção do fator etiológico, por meio de intervenções de tratamento periodontal convencional (como raspagem e alisamento radicular), pode interromper a progressão da doença e restaurar a saúde do paciente. Em contraste, a periodontite resulta na perda do periodonto de sustentação, sendo caracterizada pela migração apical do epitélio juncional, o qual adere à superfície dental por meio de hemidesmossomos, mantendo a integridade do sulco clínico; por essa razão, é considerada uma doença irreversível (4,5). A figura 1 ilustra essa perda de inserção e migração apical do epitélio juncional na periodontite.

Figura 1 A imagem ilustrativa mostra as condições do periodonto de proteção e sustentação em dois estágios: Gengivite, apresentando inflamação da gengiva, sem comprometimento do periodonto de sustentação (ligamento periodontal e osso

alveolar permanecem intactos) e Periodontite, onde a inflamação avança, causando a perda de inserção periodontal e reabsorção óssea, resultando em danos ao periodonto de sustentação.



Fonte: https://neolifeodontologia.com.br/voce-sabe-o-que-e-gengivite/

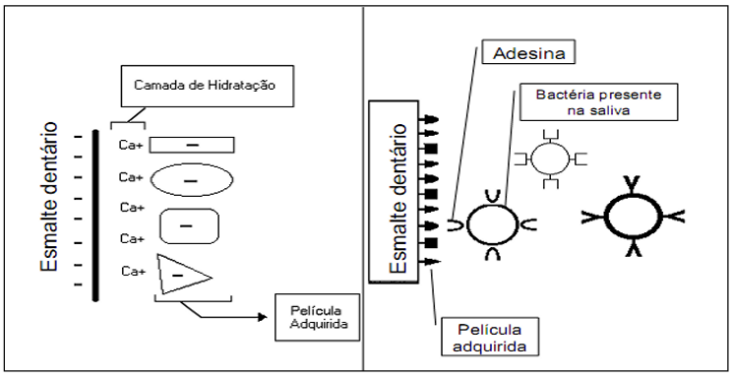
A doença periodontal, por sua natureza, é uma enfermidade inflamatória crônica e multifatorial, desencadeada por um complexo de espécies bacterianas que interagem com os tecidos e células do hospedeiro. As bactérias liberam enzimas como a colagenase, enquanto as células do sistema imunológico — incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos — reagem a essa agressão bacteriana, liberando colagenase e citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6, TNF-α e PGE2), o que resulta na destruição progressiva dos tecidos de proteção (gengiva) e de sustentação (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal) do dente, culminando na formação de bolsas periodontais (6,7).

Para que a doença periodontal se inicie, é imprescindível a presença do biofilme, que se caracteriza como uma comunidade de bactérias, englobando uma ou várias espécies, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Essas bactérias se aderem à superfície dental nas proximidades da margem gengival, no sulco gengival ou nas bolsas periodontais, causando alterações fisiológicas e metabólicas. O mecanismo de quorum sensing é fundamental nesse contexto, pois regula diversos processos fisiológicos por meio de uma comunicação intercelular que controla a expressão gênica em resposta à densidade populacional. A capacidade das células bacterianas de se comunicar e atuar coletivamente oferece vantagens significativas em termos de colonização, defesa contra outros microrganismos e diferenciação celular (8–10).

O processo de formação do biofilme inicia-se com a criação de uma película adquirida, uma fina camada acelular composta de proteínas e glicoproteínas provenientes da saliva e do fluido gengival, que se adere à superfície dentária. Após a formação dessa película, as bactérias

são capazes de se fixar, dando início à colonização por bactérias gram-positivas, conhecidas como colonizadores primários, como é demonstrado na figura 2 logo abaixo.

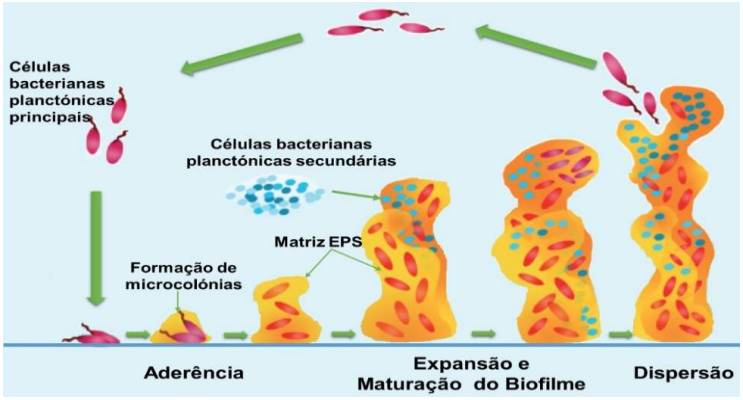
Figura 2 Imagem ilustrativa da película adquirida e adesão das colonizadoras primárias



Fonte: Adaptada de B. Nyvad e O. Fejerskov, in: A. Thylstrup, O. Fejerskov. Tratado de Cariologia. Ed. Cultura Médica, RJ, 1ª. edição, 1988.

Subsequentemente, ocorre a co-agregação de novas bactérias gram-negativas, os colonizadores secundários, que contribuem para a formação das micro-colônias, resultando em um aumento da massa do biofilme, o que facilita a agregação de microrganismos sem capacidade de adesão. O biofilme maduro, por sua vez, pode ser considerado uma comunidade clímax, onde a população microbiana atinge um estado de estabilidade e equilíbrio (11,12). A figura 3 demonstra exatamente esse crescimento da massa de biofilme.

Figura 3 Imagem ilustrativa da formação do biofilme maduro



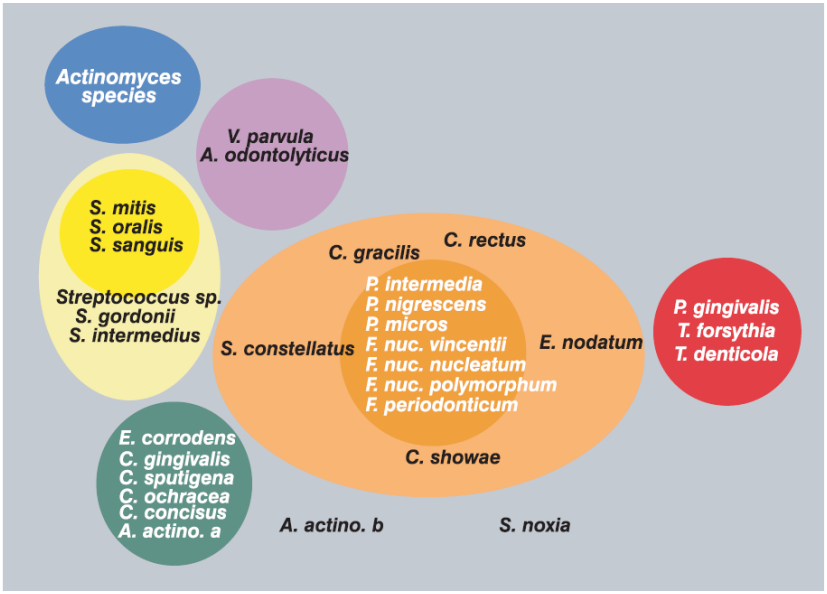
Fonte: https://farmaceuticodigital.com/2021/09/biofilmes.html

Cada espécie bacteriana interage de maneira específica com suas parceiras, formando cinco complexos bacterianos distintos. Os complexos amarelo, roxo e verde são constituídos

por espécies que se encontram na fase inicial da colonização. As bactérias desses complexos fornecem receptores e criam condições ecológicas propícias para as espécies do complexo laranja, que precedem a colonização por aquelas do complexo vermelho, que são predominantemente anaeróbicas e Gram-negativas, como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. (10,13).

Outra espécie bacteriana, que não se enquadra no complexo vermelho, foi identificada na região subgengival, revelando-se um fator de risco significativo para a degradação dos tecidos de suporte do dente. Trata-se de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a), classificada como uma bactéria periodontopatogênica devido à sua capacidade de sobreviver em condições de microaerofilia (13). A dinâmica de colonização patológica pode ser observada na figura 4.

Figura 4 Representação do diagrama da associação entre micro-organismos em amostras de biofilme subgengival descrito por Socransky et al., 1998



Fonte: Socransky et al., 1998

Além dessas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também se destaca na região subgengival, atuando como um fator de risco para a degradação dos tecidos de suporte do dente. Reconhecida como uma bactéria periodontopatogênica, essa espécie é capaz de sobreviver em condições de microaerofilia e está fortemente associada à patogênese de doenças periodontais, em especial à periodontite agressiva. A persistência dessa bactéria nos tecidos, mesmo após

procedimentos de raspagem e alisamento radicular, muitas vezes resulta em reinfecção das bolsas periodontais, levando ao uso crescente de antibióticos sistêmicos na odontologia, o que, por sua vez, contribui para um aumento da resistência bacteriana. Além disso, essas microrganismos podem estar associados a condições infecciosas que transcendem o periodonto, afetando outras áreas do corpo, como em casos de endocardite, pericardite, artrite bacteriana e osteomielite (14–17).

O tratamento periodontal é frequentemente dividido em três fases: a remoção do fator causal da doença (terapia básica), a intervenção cirúrgica (quando necessário) e o controle e manutenção. Embora variações nas abordagens terapêuticas sejam necessárias para as diferentes formas de doença periodontal, essas três etapas são geralmente aplicáveis a pacientes com periodontite. A terapia básica concentra-se na eliminação do biofilme supragengival e subgengival, por meio de raspagem e alisamento corono-radicular utilizando instrumentos específicos e/ou ultrassônicos. É crucial que o paciente mantenha um rigoroso controle de higiene bucal durante e após o tratamento. A terapia cirúrgica é indicada para áreas que, mesmo após tratamento, apresentam persistência nos sinais clínicos de inflamação e não apresentam redução das bolsas periodontais, proporcionando acesso para raspagem, facilitando a higiene e eliminando bolsas residuais. Por fim, a terapia de controle e manutenção visa prevenir a recorrência da doença periodontal, necessitando de visitas periódicas ao cirurgião-dentista para a realização de procedimentos de eliminação do biofilme. Entretanto, em alguns casos, o tratamento periodontal convencional pode não ser suficiente para erradicar todos os microrganismos periodontopatogênicos, tornando a complementação com antimicrobianos sistêmicos uma opção viável (6,7,16).

1.2 ANTIBIÓTICOTERAPIA SISTÊMICA

A antibioticoterapia sistêmica frequentemente se torna indispensável como complemento à terapia periodontal não cirúrgica, especialmente em casos mais severos de periodontite, quando a resposta do hospedeiro não se mostra satisfatória, resultando na persistência de bolsas residuais repletas de depósitos microbianos. Os antibióticos mais comumente utilizados para a complementação em periodontites associadas a bolsas mais profundas, caracterizadas por escassez de oxigênio, presença de nutrientes proteolíticos e predominância de microrganismos anaeróbios e Gram-negativos, incluem a amoxicilina e o

metronidazol. No entanto, uma variedade de outros antibióticos também se revela eficaz no tratamento periodontal, tais como azitromicina, tetraciclina, doxiciclina e minociclina (18,19).

Diversos estudos corroboram a utilização da antibioticoterapia como uma terapia adjuvante nas doenças periodontais, sendo a combinação de amoxicilina e metronidazol considerada o padrão ouro. Para garantir o sucesso do tratamento, é essencial realizar uma análise individual e criteriosa do quadro clínico e sistêmico do paciente. Ademais, a prescrição adequada deve respeitar o princípio de administrar a maior dose pelo menor período de tempo, a fim de promover a adesão completa ao tratamento e minimizar o risco de resistência bacteriana (19–22).

Embora seja inegável que o uso de antibióticos tenha salvado milhares de vidas desde sua descoberta, o uso abusivo e inadequado, seja por automedicação ou em casos de recidivas, resultou em uma série de complicações. Entre essas, destacam-se a baixa adesão dos pacientes ao tratamento, dificuldades em manter concentrações terapêuticas de antimicrobianos no biofilme periodontal, além de reações alérgicas, problemas gastrointestinais e o alarmante aumento da resistência bacteriana. Esses fatores ressaltam a necessidade de uma abordagem mais consciente e criteriosa no uso de antibióticos na prática clínica (22,23).

A resistência microbiana refere-se à capacidade das bactérias de se multiplicarem na presença de antimicrobianos em concentrações superiores às empregadas nas terapias habituais. O uso inadequado desses medicamentos provoca a eliminação ou adaptação dos microrganismos, um fenômeno denominado “pressão seletiva”, no qual a seleção natural favorece os mais aptos. Nesse contexto, torna-se viável o crescimento e o desenvolvimento de patógenos em ambientes que, normalmente, seriam letais para eles, exacerbando o desafio no tratamento de infecções (20,24).

O insucesso do tratamento periodontal pode ser atribuído à dificuldade no controle microbiano decorrente do uso excessivo de antimicrobianos. Diante dessa realidade, pesquisadores têm buscado métodos alternativos para o tratamento das doenças periodontais, visando prevenir a resistência microbiana (19,22,23).

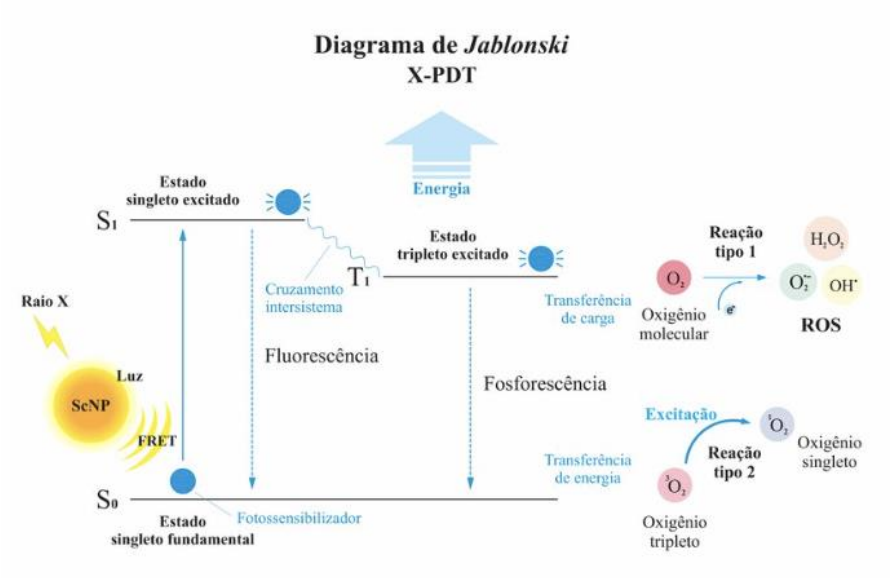
Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana surge como uma abordagem relativamente nova na odontologia, sendo empregada como terapia coadjuvante ao tratamento convencional. Essa técnica não apenas oferece uma alternativa promissora, mas também busca otimizar a eficácia das intervenções periodontais

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), é uma abordagem minimamente invasiva que combina a aplicação de um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e a presença de oxigênio para tratar infecções. Após a aplicação do FS no local afetado, o corante interage com o oxigênio celular, e a iluminação com um comprimento de onda que coincide com o pico de absorção do FS resulta na geração de radicais livres (reação tipo I) ou na formação de oxigênio singlete (reação tipo II), ambos considerados cruciais para a morte celular bacteriana (25–27).

O mecanismo de ação da aPDT pode ser ilustrado pelo diagrama de Jablonski, conforme demonstrado na figura 5. O FS absorve luz visível em um comprimento de onda específico, transitando do estado singlete fundamental (S0) para o primeiro estado excitado singlete (S1), que possui um tempo de vida breve. Nesse estado, o FS pode dissipar energia por meio de processos radioativos, como a fluorescência, ou converter-se ao estado triplete (T1) via cruzamento intersistemas. O estado triplete, por ter um tempo de vida maior em comparação ao estado singlete, permite que o FS perca energia também por fosforescência ou participe da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de dois mecanismos distintos: a reação tipo I, que envolve a transferência de elétrons e a formação de radicais livres, e a reação tipo II, que envolve a transferência de energia ao oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete. A ocorrência dessas reações depende de vários fatores, incluindo as características físico-químicas do FS e o microambiente em que está inserido, o que afeta seu estado de agregação e a disponibilidade de oxigênio e outros substratos (26,28,29).

Figura 5 Representação do diagrama de Jablonski, o qual contém todos os processos que vão acontecer desde a absorção de luz até iniciar a resposta biológica



Fonte:https://www.researchgate.net/figure/Diagrama-de-Jablonski-X-PDT-Os-raios-X-excitam-as-nanoparticulas-cintiladoras-que_fig9_376033452

Na odontologia, a fonte de luz mais utilizada na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é o laser de baixa potência, uma forma de radiação eletromagnética monocromática. Entretanto, também se pode utilizar o LED (diodo emissor de luz), que representa uma radiação eletromagnética policromática (30).

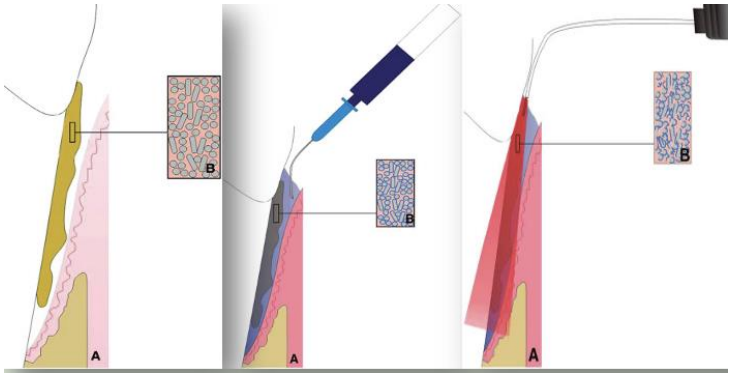
A descoberta de que a aPDT pode ser empregada no tratamento de infecções locais, e suas aplicações clínicas estão em contínuo desenvolvimento. Entre as indicações, destacam-se o tratamento de infecções orais, infecções bacterianas dermatológicas e dentais, úlceras infectadas e células cancerígenas. Na odontologia, essa terapia tem demonstrado eficácia e resultados promissores em condições como herpes labial, estomatites, mucosite oral, líquen plano oral, alveolite e periodontite, além de auxiliar na halitose (24,27).

A aPDT é uma forma de fototerapia que possibilita a eliminação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários parasitas. Sua principal vantagem reside na eficácia que independe do padrão de resistência das espécies microbianas, apresentando um amplo espectro de ação, inclusive contra microrganismos resistentes a antimicrobianos. Por essa razão, é frequentemente utilizada como adjuvante no tratamento convencional das periodontites. Além disso, a terapia promove a remodelação do ligamento periodontal e do cemento, reestabelecendo o nível clínico de inserção, facilitando a eliminação de bactérias subgengivais

e resultando em uma microbiota bucal mais favorável, o que melhora a qualidade tecidual (25,27,31).

No tratamento periodontal, após a desorganização do biofilme por meio das raspagens e alisamentos radiculares, as bolsas periodontais podem ainda abrigar bactérias residuais, tornando necessária a complementação com antimicrobianos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) se apresenta como uma alternativa valiosa, atuando como um tratamento complementar para as doenças periodontais e ajudando a evitar o uso excessivo de medicamentos, o que, por sua vez, reduz o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana. Essa terapia envolve a administração tópica de um fotossensibilizador (FS), que se distribui nas bolsas periodontais e se acumula nos tecidos. Ao ser ativado pela exposição à luz de um laser ou LED com parâmetros dosimétricos adequados, o FS promove alterações fotoquímicas que resultam na destruição do tecido alvo, conforme ilustrado na figura 6. Essa abordagem não apenas melhora a eficácia do tratamento, mas também contribui para a manutenção da saúde periodontal a longo prazo (6,32–34).

Figura 6 Demonstração clínica da aPDT nas bolsas periodontais para tratamento complementar aos procedimentos básicos da doença periodontal



Fonte: de Oliveira RR1 et al., J Periodontol. 2007 Jun;78(6):965-73

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem demonstrado eficácia na eliminação de periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*. O mecanismo de destruição desses microrganismos envolve alterações nas membranas celulares e/ou nas proteínas da membrana plasmática, além de danos ao DNA, mediados pela presença de oxigênio singlete (9,35).

Os protocolos de aplicação clínica na periodontia ainda carecem de padronização, por isso observamos na literatura diversos resultados clínicos. Estudos têm sido realizados para aprimorar o desempenho dessa terapia, explorando diferentes protocolos de aplicação de luz e variados fotossensibilizadores em distintas concentrações (36,37).

1.4 FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZINAS

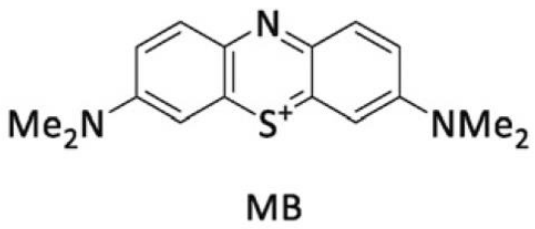
Os fotossensibilizadores (FS) são corantes que devem possuir características específicas, incluindo estabilidade cinética e termodinâmica, rápida síntese, alto rendimento, baixo custo, ausência de agregação em meio biológico, farmacocinética favorável e baixa toxicidade em condições de ausência de luz (38).

Outro aspecto crucial na escolha de um FS é o comprimento de onda ideal para sua fotoativação. A densidade óptica de máxima absorbância deve situar-se entre 600 e 850 nm, englobando a região espectral do vermelho visível e do infravermelho (36,38).

Na odontologia, a classe de fotossensibilizadores frequentemente utilizada são as fenotiazinas, representadas pelo azul de metileno (AM), azul de toluidina O (ATO) e butil azul de toluidina O (BuTBO). As fenotiazinas são moléculas planas tricíclicas anfipáticas que contêm um átomo de nitrogênio quaternário intrínseco e demonstram eficácia fototóxica contra periodontopatógenos como *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Essas moléculas apresentam intensa absorção quando expostas à luz visível em torno de 600-660 nm, permitindo uma penetração eficaz da luz nos tecidos (33,39,40).

Abaixo, nas figuras 7 e 8, são apresentadas as representações das estruturas moleculares dos dois fotossensibilizadores fenotiazinas mais conhecidos na odontologia: o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina O (ATO).

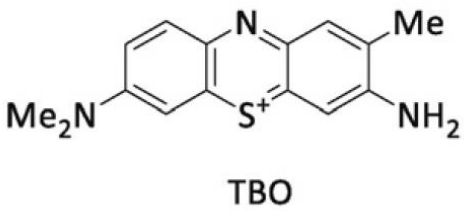
Figura 7 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de metileno (M. Wainwright et al;2016)



MB

Fonte: M. Wainwright et al;2016.

Figura 8 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de toluidina (M. Wainwright et al;2016)



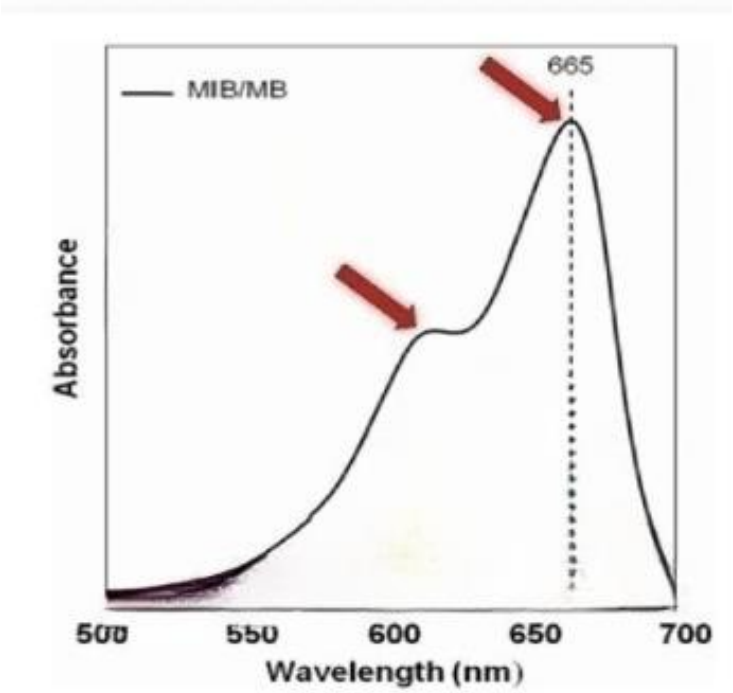
TBO

Fonte: M. Wainwright et al;2016.

A carga positiva e a geometria planar do azul de metileno (AM) facilitam sua intercalação na estrutura do DNA, especialmente em regiões ricas em guanina e citosina. Essa interação pode resultar em quebras na cadeia do DNA e degradação oxidativa das bases, mediada pelo oxigênio singlete. Além disso, o AM tende a se acumular preferencialmente nas mitocôndrias, uma vez que é atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (39,41).

A agregação do azul de metileno varia conforme o meio e a concentração em que se encontra, influenciando diretamente os tipos de reações fotoquímicas que ocorrem e, consequentemente, a eficiência do tratamento com a aPDT. Essa agregação pode ser identificada através do espectro de absorção: enquanto o dímero apresenta uma absorção em 610 nm, o monômero é observado em 660 nm. Essa diferença no estado de agregação é fundamental para otimizar os resultados terapêuticos da aPDT (39,40,42).

Figura 9 Gráfico representado o espectro de absorção do azul de metileno. As setas vermelhas representam os picos de absorção no estado de monômero (660nm) e dímero (610 nm). TAO et.al., 2014



Fonte:TAO et.al., 2014

Em estudos comparativos sobre as eficácias fotoantimicrobianas do azul de metileno (AM) e do azul de toluidina O (ATO), observou-se que, embora as diferenças entre eles sejam mínimas, o AM se destaca por suas propriedades superiores em lidar com uma variedade mais ampla de desafios bacterianos, fúngicos, virais e protozoários (37,42,43).

Os corantes metacromáticos, como as fenotiazinas, são particularmente relevantes na odontologia, pois conseguem controlar sua agregação, resultando em mudanças de coloração. Esse fenômeno, conhecido como metacromásia, permite que um corante absorva luz em diferentes comprimentos de onda, dependendo da sua concentração e do meio ambiente. Em soluções concentradas, as moléculas do corante formam agregados diméricos e poliméricos, enquanto em soluções diluídas se apresentam como monômeros, exibindo uma coloração azul. Quando em soluções hipertônicas, ocorre a polimerização, resultando em mudanças na coloração do corante (30,34,42).

Uma revisão da literatura sobre a aPDT no tratamento periodontal revela um debate entre autores sobre sua eficácia. Estudos de Prates et al., Ramos et al. e Alvarenga et al. indicam que a aPDT pode promover a morte celular de bactérias residuais e resistentes após o tratamento

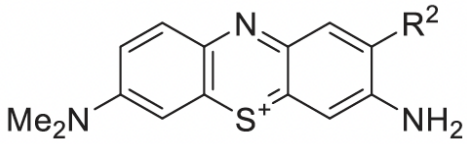
convencional, com melhorias nos parâmetros clínicos, como a ausência de sangramento à sondagem e ganho de inserção. No entanto, não existe um protocolo padronizado para os parâmetros de irradiação, gerando divergências na literatura (27,30,44).

Além disso, foi demonstrado que a aplicação do azul de metileno em soluções de etanol ou ureia se mostra mais eficaz na morte microbiana do que em água. O uso de outras moléculas, como o dodecil sulfato de sódio, também pode controlar a agregação do AM, aumentando a formação de monômeros e diminuindo a de dímeros, através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas (39,42).

1.5 BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O

O butil azul de toluidina O (BuTBO) é um fotossensibilizador inovador que integra a família das fenotiazinas. Seu desenvolvimento envolveu modificações físico-químicas na estrutura do azul de toluidina O, incluindo a substituição variável de hidrocarbonetos na posição cromófora 2. Este processo foi realizado por meio da rota anilinatiossulfônica, utilizando o oxidante suave carbonato de prata (II), o que assegurou a preservação do substituinte. Essa alteração molecular é ilustrada na figura 12 (43,45). Abaixo, a estrutura molecular do BuTBO é apresentada, destacando suas características únicas que conferem a este fotossensibilizador seu potencial promissor na terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Figura 10 Estrutura molecular do fotossensibilizador BuTBO (M. Wainwright et al;2016)



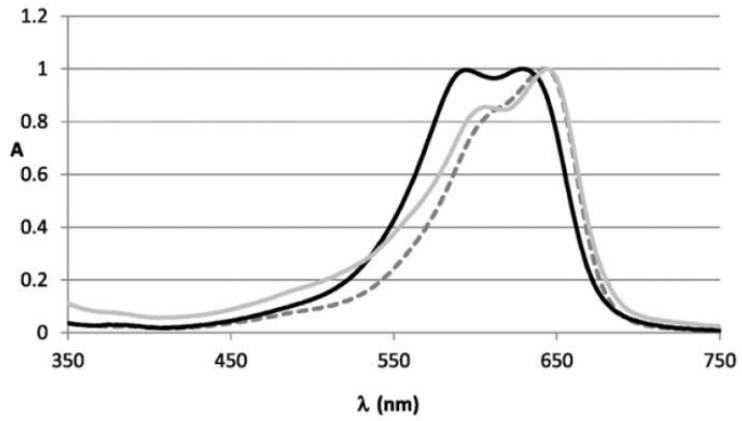
Fonte: M. Wainwright et al;2016.

O butil azul de toluidina O (BuTBO) apresenta modificações significativas em relação ao azul de toluidina O (ATO), destacando-se por diversas características aprimoradas. Entre essas, notam-se: o aumento no comprimento de onda de absorção visível, que favorece a eficiência da fototerapia; a diminuição do ombro de comprimento de onda inferior ao pico principal de absorção na região vermelha, correlacionada ao aumento do tamanho do grupo alquil na posição C-2; e a lipofilicidade elevada, resultante do aumento do teor de

hidrocarbonetos. Além disso, o BuTBO demonstrou uma redução na agregação em derivados com substituintes mais volumosos, assim como uma capacidade aumentada de produzir oxigênio singlete. Essas alterações são cruciais para a eficácia na terapia fotodinâmica antimicrobiana (43).

A figura 11 ilustra claramente as diferenças na absorção de luz visível entre o ATO e o BuTBO, permitindo uma comparação direta que evidencia as vantagens do novo fotossensibilizador.

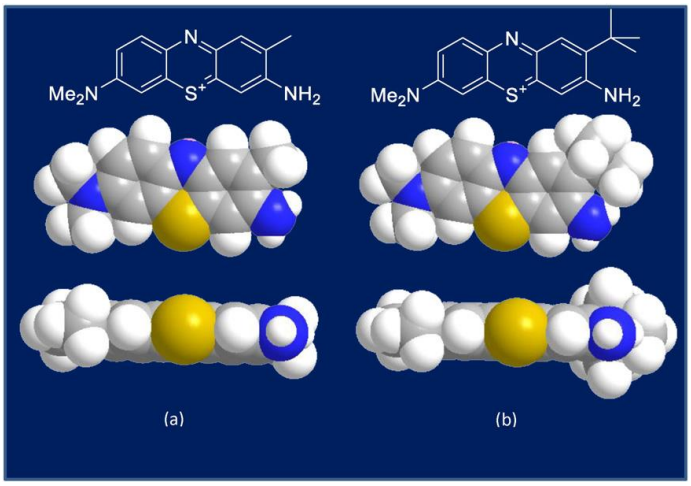
Figura 11 Absorção aquosa visível por ATO (preto) e BuTBO (traços cinzas), mostrando variação na agregação, menor comprimento de onda, ombro (concentração fotoantimicrobiana aprox. 15 μM)



Fonte: M. Wainwright et al;2016.

O deslocamento do comprimento de onda máximo observado com o aumento do tamanho do grupo de hidrocarbonetos é uma consequência da hiperconjugação, conforme esperado. A diminuição do ombro associado ao aumento do tamanho do grupo alquil indica uma redução no comportamento agregacional, que ocorre devido à dificuldade de compactação imposta pelo volume extra assimétrico. Essas mudanças de volume são ilustradas nos modelos de preenchimento de espaços, que visam a minimização da energia, evidenciando as diferenças estruturais entre o azul de toluidina O (TBO) e o butil azul de toluidina O (BuTBO) (43). A figura 12 fornece uma representação visual clara dessas interações, reforçando a eficácia do BuTBO como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica

Figura 12 Imagem ilustrativa do aumento do volume molecular assimétrico devido a 2-tert-substituição do grupo butila (BuTBO) (b) em comparação ao ATO (a) (estruturas com energia minimizada usando o software ChemDraw 3D) (M. Wainwright et al;2016)



Fonte: M. Wainwright et al;2016.

Estudos in vitro e in vivo que investigaram o uso do butil azul de toluidina O (BuTBO) como fotossensibilizador em tratamentos periodontais revelaram resultados promissores. Os dados indicam uma diminuição significativa do processo inflamatório e uma melhoria na reparação do tecido conjuntivo. Além disso, observou-se uma eficácia fotoantimicrobiana superior em comparação ao azul de metileno (AM) e ao azul de toluidina O (ATO), bem como um controle mais eficaz da perda óssea em modelos de periodontite experimental. Esses achados reforçam o potencial do BuTBO como uma alternativa eficaz na terapia fotodinâmica antimicrobiana no contexto periodontal, por tanto neste estudo a aPDT com esse fotossensibilizador foi utilizada para inativação do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* (43,45).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Verificar a eficácia do BuTBO na morte de *A. actinomycetemcomitans* com laser a 660 nm em diferentes tempos de irradiação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Verificar o tempo de irradiação mais efetivo na morte de *A. actinomycetemcomitans*.

3. METODOLOGIA

3.1 CONFECÇÃO DA SUSPENÇÃO MICROBIANA

As cepas padrão da bactéria Gram negativa anaeróbica facultativa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) foram cultivadas em microaerofilia utilizando meio caldo infusão de cérebro e coração (BHI) em tubos plásticos de 15 mL, incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano ocorreu em uma estufa bacteriológica com uma atmosfera controlada de 5-10% de CO_2, gerada pela técnica da chama de vela. Uma vela, fixada na parede inferior de um recipiente hermético, foi acesa e observada até sua extinção, permitindo a queima do oxigênio (O_2) e sua conversão em dióxido de carbono (CO_2) (9).

Após a preparação do inóculo, o material foi centrifugado a 2800 RPM por 5 minutos para remover o líquido sobrenadante. O sedimento bacteriano foi resuspendido em 8 mL de solução salina tamponada (PBS) e homogeneizado em um vortex. Para obter uma concentração bacteriana padrão, 150 µL da suspensão foi transferido para outro tubo de 15 mL contendo 8 mL de PBS, resultando na suspensão padrão desejada com uma concentração de 10^8 células (9).

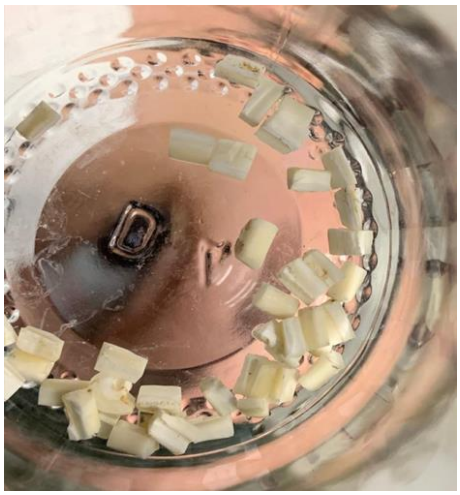
Todos os experimentos seguram o “Manual para elaboração de experimentação em Microbiologia” do programa de Medicina-Biofotônica da UNINOVE.

3.2 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS BOVINAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da Universidade Nove de Julho, sob o número de protocolo 3956031022. Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram as diretrizes do CEUA e os padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizadas 24 raízes de incisivos bovinos, cada elemento foi cortado em segmentos de 2 x 4 mm utilizando um disco de carborundum. Após a confecção dessas amostras, elas foram colocadas em uma jarra contendo 250 mL de água destilada e esterilizadas em autoclave.

Figura 13 Imagem ilustrativa das amostras bovinas cortadas em 2 x 4 mm.



3.3 PREPARO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

O fotossensibilizador utilizado foi o corante butil azul de toluidina O, preparado na concentração final de 100 µM. A solução mãe foi feita a partir de uma concentração de 10.000 µM, diluindo o pó em água deionizada. Esta solução foi filtrada por uma membrana estéril de 0,22 µm (Milipore, SP, Brasil) e armazenada em eppendorfs, protegida da luz. Para o experimento, foi preparado um tubo plástico (eppendorf) contendo 1 mL de PBS e 10 µL de butil azul de toluidina O, resultando na concentração final de 100 µM (9).

3.4 FONTE DE IRRADIAÇÃO

A fonte de luz utilizada para a excitação do fotossensibilizador foi um laser de diodo (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil). As irradiações foram feitas com uma presilha onde todos os poços foram irradiados com a mesma distância da ponta do laser á entrada do poço da placa de 24 poços. Os parâmetros de irradiação utilizados no experimento estão detalhados na tabela a seguir (Tab. 1).

Tabela 1. Dosimetria da fonte de luz laser que foi utilizada nos experimentos.

Parâmetros de irradiação	Laser
Comprimento de onda (nm)	660 ± 2
Modo de operação	Continuo
Potência radiante (mW)	100
Área do feixe (cm^2)	0,4
Diâmetro do feixe (cm)	0,714
Irradiância (mW/ cm^2)	250
Tempo de exposição (s)	60, 180, 300
Tempo de pré-irradiação (s)	60
Exposição radiante (J/cm^2)	15, 45, 75
Energia radiante (J)	6,18, 30

3.5 CRESCIMENTO DO BIOFILME MICROBIANO NAS AMOSTRAS DENTAIS

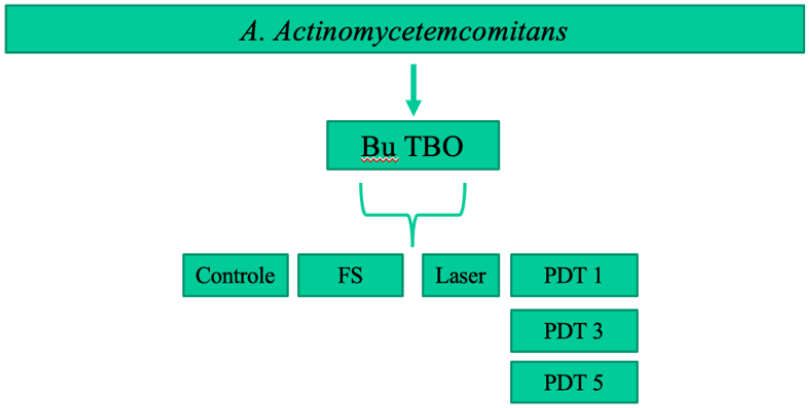
As amostras estéreis e hidratadas foram introduzidas em uma placa de 48 poços, com cada amostra alocada em um poço individual. Em seguida, as amostras foram expostas à saliva artificial Kin Hidrat® spray por 2 horas para permitir a formação de uma película adquirida. Após a remoção da saliva artificial, as amostras foram colocadas em contato com o inóculo em meio de cultura BHI, com aproximadamente 10^8 UFCs/mL da cepa *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523. A incubação foi realizada por 48 horas em microaerofilia, gerada pela técnica da chama de vela, criando uma atmosfera com 5 a 10% de CO_2.

3.6 GRUPOS AMOSTRAIS

Amostras de inóculos de A. actinomycetemcomitans ATCC 29523 foram utilizadas em um grupo experimental, o grupo BuTBO (Butil azul de toluidina O). Dentro deste grupo temos 6 subgrupos, sendo eles o grupo controle (C); grupo laser (L) que corresponde a irradiação máxima de laser por 5 minutos; grupo fotossensibilizador (FS) sem irradiação, porém fica em

contato com o FS durante 1 min correspondendo ao tempo de pré irradiação, e os grupos PDT que apresenta o FS de escolha e diferentes tempos de irradiação (PDT1) com 1 minuto de irradiação; (PDT3) com 3 minutos de irradiação e (PDT5) com 5 minutos de irradiação como demonstrado na figura abaixo.

Figura 14 Fluxograma dos grupos experimentais



3.7 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (APDT)

Após a formação do biofilme sobre as superfícies das amostras bovinas, as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS. Esse procedimento teve como objetivo remover qualquer micro-organismo flutuante, garantindo que as condições experimentais fossem adequadas para a avaliação da eficácia do tratamento. A lavagem é crucial para minimizar interferências na análise dos resultados.

Figura 15 Imagem ilustrativa das amostras lavadas em PBS



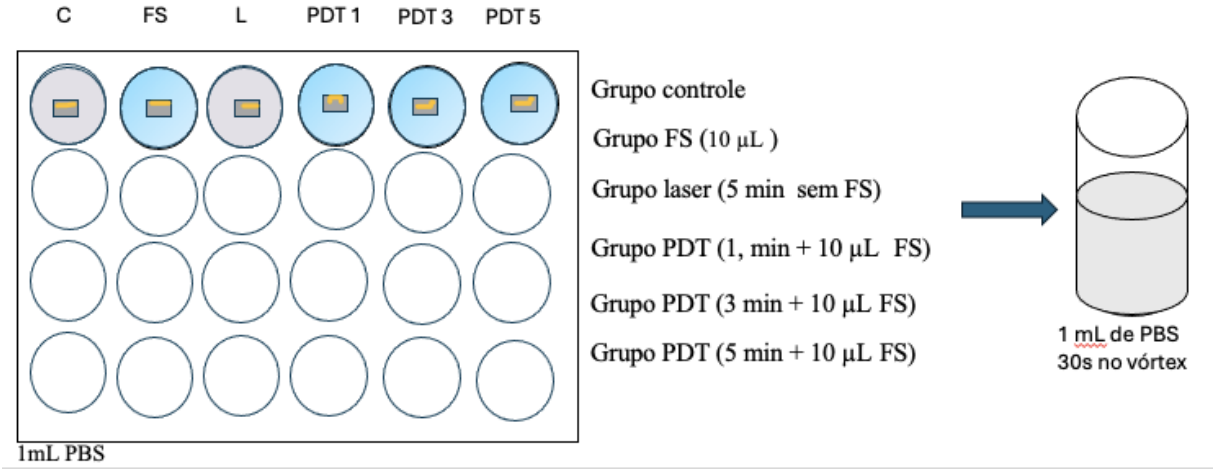
Após a lavagem das amostras, foram introduzidas em uma placa de 24 poços, onde cada poço continha 1 mL de PBS e uma amostra bovina com biofilme formado sobre ela. Foram utilizados 6 poços, onde cada um representou um dos grupos experimentais: controle, fotossensibilizador, laser, PDT 1, PDT 3 e PDT 5.

As irradiações foram feitas com uma presilha onde todos os poços foram irradiados com o laser de diodo na mesma altura, próximo ao poço.

No grupo controle, todo o conteúdo do poço foi levado a um micro tubo plástico. No grupo laser, o poço foi irradiado por 5 min e logo após levado a um micro tubo plástico. No grupo fotossensibilizador, foi introduzido 10 µL de FS, deixando o biofilme em contato durante 1 min (correspondendo ao tempo de pré irradiação), e logo após todo conteúdo foi levado para um micro turbo plástico. Para o grupo PDT 1, PDT 3 e PDT 5, cada poço correspondente foi introduzido 10 µL de FS e irradiado com laser durante 1, 3 e 5 min e logo após levados a um micro tubo plástico.

Após a preparação dos tubos plasticos, todos foram homogeneizados em vórtex por 30s, como demonstrado na imagem 16.

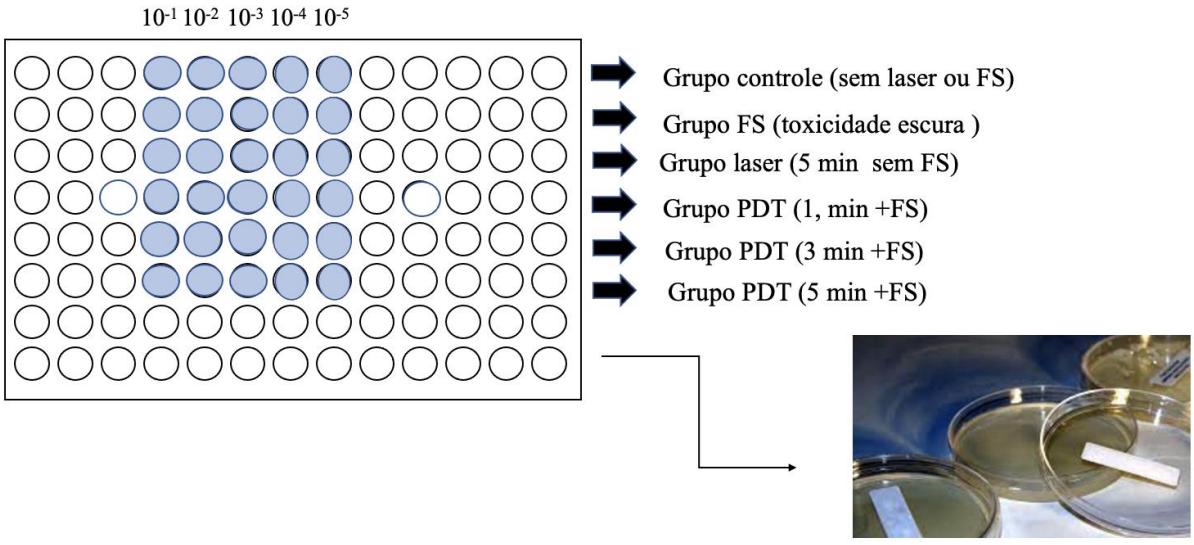
Figure 16 Imagem ilustrativa da terapia fotodinâmica nos poços nos grupos amostrais.



Em seguida, 100 µL dos tubos plásticos de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços, onde cada poço continha 180 µL de PBS para a realização de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}).

Alíquotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em triplicata em placas de ágar BHI, que foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas para a formação de unidades formadoras de colônias (UFC), que seriam contabilizadas para análise. Esse experimento foi repetido três vezes em dias diferentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Figura 17 Representação esquemática da placa de 96 poços ilustrando a diluição seriada dos grupos experimentais e a imagem a direita representa as placas de ágar BHI



3.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As amostras foram preparadas para a determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Cada tubo contendo 1 mL de BHI foi agitado em vórtex e submetido a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5}, conforme ilustrado na Figura 18. Em seguida, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em forma de estrias sobre a superfície do ágar BHI em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 48 a 72 horas em condições de anaerobiose para a recuperação das bactérias. Após a incubação, as UFC foram contadas e os dados foram submetidos à análise estatística para avaliação da eficácia dos tratamentos experimentais.

3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para criar imagens da estrutura do biofilme após a aPDT. Biofilmes de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 foram cultivados em amostras de 2 × 4 mm de raiz dentária bovina. As amostras, previamente esterilizadas e hidratadas, foram colocadas em uma placa de 48 poços e expostas a saliva artificial Kin Hidrat® Spray por 2 horas para a formação de uma película adquirida. Após a remoção da saliva, as amostras foram colocadas em contato com um inóculo em meio de cultura BHI, com aproximadamente 10^5 UFCs/mL, durante 48 horas em microaerofilia gerada pela técnica da chama de vela, que cria uma atmosfera com 5 a 10% de CO2. Após a incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,2) para remover microrganismos flutuantes. A aPDT foi realizada em uma placa de 24 poços, onde cada poço continha 1 mL de PBS e uma amostra com o biofilme. Os grupos experimentais incluíram controle, fotossensibilizador, laser, PDT 1 (1 minuto), PDT 3 (3 minutos) e PDT 5 (5 minutos), com 10 µL de BuTBO em cada grupo que utilizou o fotossensibilizador. Após a irradiação, os espécimes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% por 1 hora a 25°C, seguidos de fixação secundária em tetróxido de ósmio a 1% e desidratação em etanol (50, 60, 70, 80, 90 e 100%). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000 em uma colaboração com a UFABC, em

ampliações de 4000× e 8000×, com 15 kVA, focando nas áreas de maior densidade de biofilme. Para avaliação qualitativa da estrutura do biofilme, foram observados três espécimes por grupo.

3.10 ANÁLISE ESTATISTICA

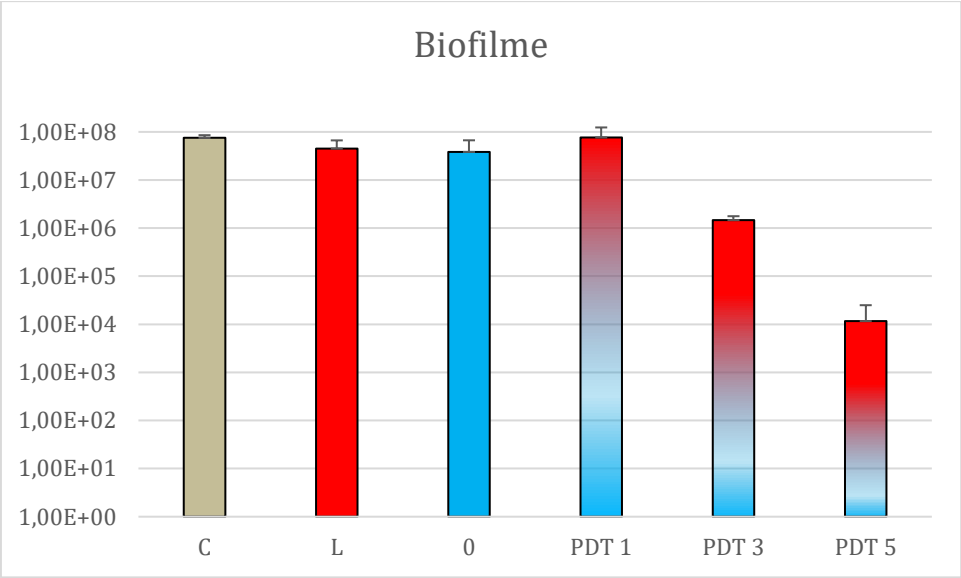
As análises foram realizadas utilizando o software OriginPro 8. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para verificar a distribuição dos dados. Para a análise de variância, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey para comparações de médias. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Além disso, o poder do teste para a amostra foi calculado, com resultado fixado em 1.

4. RESULTADOS

Após a contabilização e análise das unidades formadoras de colônias (UFCs) em triplicata com o inóculo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, foram comparados os efeitos dos diferentes tratamentos sobre os grupos amostrais. Como ilustrado na figura 18, o grupo Controle apresentou 10^8 células. Nos grupos Laser (com irradiação de 5 min) e FS (fotossensibilizador BuTBO sem irradiação), a quantidade de células permaneceu estável, sem redução significativa.

No grupo PDT com 1 min de irradiação, também não houve alteração ($p > 0,05$). No entanto, observou-se uma mudança significativa a partir do grupo PDT com 3 min de irradiação ($p < 0,01$). O grupo que recebeu PDT por 5 min apresentou a maior redução na contagem microbiana, em comparação aos demais grupos ($p < 0,01$). A partir da PDT de 3 min, houve uma diminuição de 2 logs nas UFCs, reduzindo de 10^8 para 10^6 células. Com a PDT de 5 min, a redução foi de 4 logs, passando de 10^8 para 10^4 células, o que representa uma diminuição de 99,99%, resultando em 10 mil células restantes.

Figura 18 Representação gráfica dos resultados obtidos após microscopia eletrônica de varredura. As barras representam as médias e desvio padrão de bactérias viáveis recuperadas do biofilme. O eixo X apresenta os grupos testados e o eixo Y quantifica UFC/mL



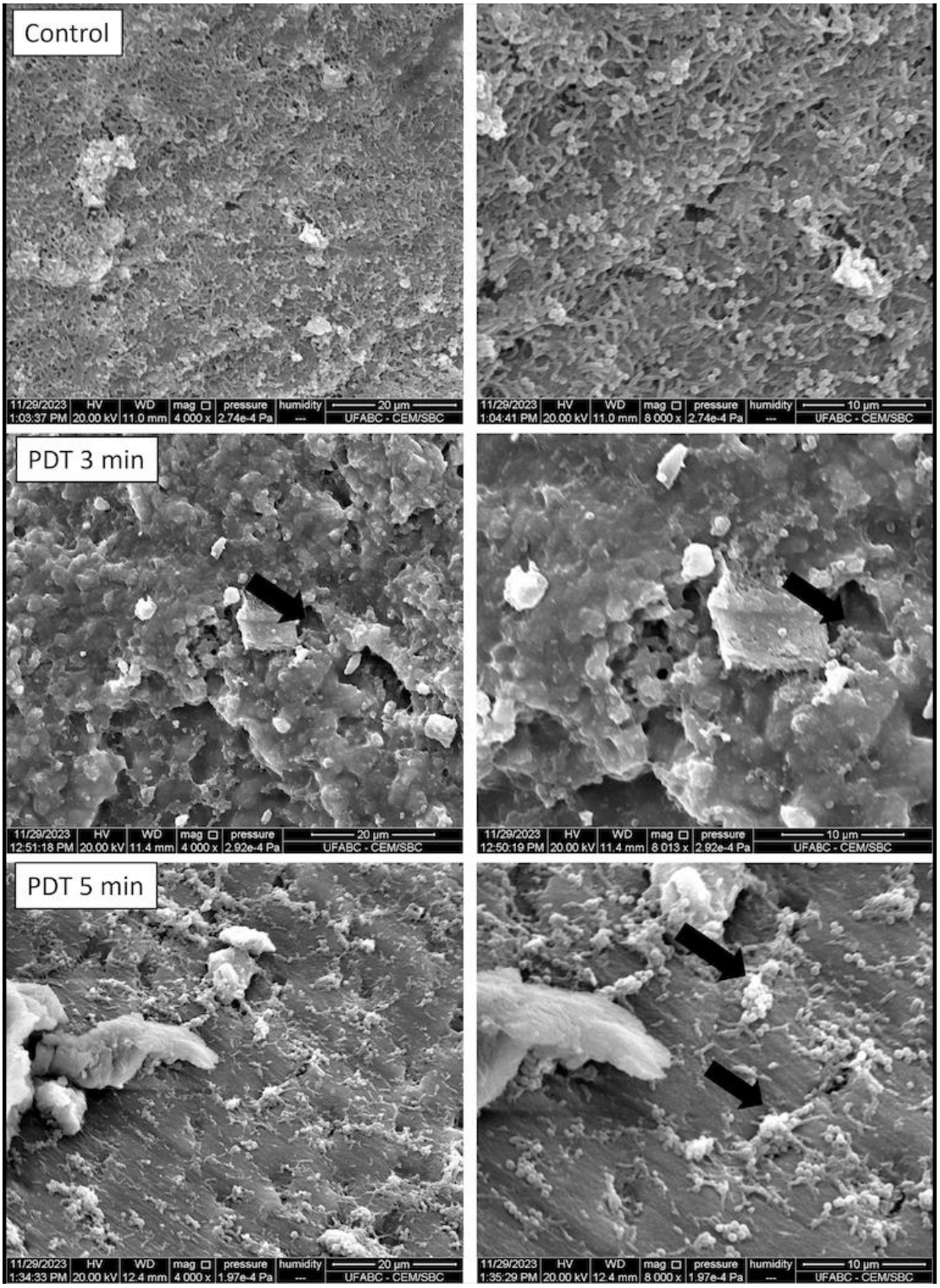
Na Imagem 19, observamos as avaliações realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* crescido e aderido sobre as amostras bovinas.

As avaliações microscópicas foram realizadas nos grupos Controle, PDT 3 min e PDT 5min. Na imagem abaixo os grupos possuem duas ilustrações, sendo a do lado esquerdo obtidas com um aumento de 4000 vezes, e ao lado direito um aumento de 8000 vezes.

Pode-se observar que na imagem do grupo controle a superfície da amostra bovina se encontra completamente coberta com biofilme, porém em uma única camada. Em contrates, no grupo PDT 3 min, a cobertura do biofilme é mais escassa, permitindo a visualização da superfície da amostra em alguns pontos, com células ainda presentes, indicadas por setas pretas. No grupo PDT 5 min, as células estão presentes em menor quantidade e mostram características anormais, como perda de integridade da membrana e maior espaçamento entre elas. Essa imagem revela um pequeno aglomerado de células, sugerindo oxidação da matriz do biofilme, com a superfície da amostra apresentando mais *smear layer* do que células. Esses resultados destacam a eficácia da aPDT na redução do biofilme.

Ao analisar o MEV de cada grupo, fica evidente que a aPDT resultou em uma morte bacteriana significativa em comparação ao grupo controle. Especialmente no grupo PDT 5 min, a superfície da amostra bovina apresenta uma grande área exposta, com uma quantidade reduzida de células visíveis. Essa observação indica uma redução bacteriana expressiva, evidenciando a eficácia do tratamento na eliminação do biofilme de *A. actinomycetemcomitans*.

Figura 19 Imagem da microscopia eletrônica de varredura dos grupos controle, PDT 3 min e PDT 5 min. No lado esquerdo das imagens temos um aumento de 4000 vezes e no lado direto temos as imagens em um aumento de 8000 vezes.



DISCUSSÃO

Estudos clínicos anteriores que investigaram o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como adjuvante no tratamento periodontal têm apresentado resultados inconsistentes, especialmente devido à ausência de padronização nos parâmetros de irradiação e à ampla variação nas profundidades das bolsas periodontais, que geralmente são profundas. Nessas condições, a luz frequentemente não atinge o fundo das bolsas, comprometendo a eficácia da aPDT, uma vez que a terapia depende da combinação ideal entre luz e um agente fotossensibilizador (FS). Além disso, a baixa tensão de oxigênio em ambientes periodontais profundos representa uma limitação adicional para a aPDT. Este estudo in vitro foi realizado com o objetivo de avaliar se a utilização de um novo fotossensibilizador, o butil azul de toluidina O, poderia modificar suas características fotoquímicas e, consequentemente, impactar sua eficiência, gerando potenciais benefícios clínicos. Os parâmetros utilizados foram selecionados com base em uma revisão bibliográfica, considerando os mais citados na literatura, além de dados obtidos em estudos-piloto realizados por nosso grupo (9,33).

De acordo com de Freitas et al., aPDT demonstrou eficácia na redução de *S. mutans* em biofilmes monoespécies, mas os biofilmes multiespécies mostraram-se mais resistentes à ação antimicrobiana. Essa resistência pode ser atribuída à maior espessura e complexidade dos biofilmes multiespécies. O tipo de fotossensibilizador utilizado e o tempo de aplicação da terapia também desempenham papéis cruciais na eficácia antimicrobiana, uma vez que a dose parece ser determinante para a eliminação das bactérias. Para superar essas limitações, pode ser necessário explorar alternativas, como a utilização de fotossensibilizadores que penetrem mais eficientemente na matriz do biofilme ou a implementação de ondas fotomecânicas para impulsionar a penetração do fotossensibilizador. Neste estudo, ao utilizar um biofilme monoespécies de *A. actinomycetemcomitans*, obtiveram-se resultados positivos na morte microbiana. Esses resultados podem ser atribuídos ao uso do butil azul de toluidina O como fotossensibilizador, à estrutura do biofilme (que era uma única camada) ou à combinação de ambos os fatores. Ao avaliar a morte microbiana com aPDT, é fundamental considerar não apenas os parâmetros dosimétricos e a fonte de luz, mas também a espessura do biofilme. Essa interação complexa é essencial para compreender a eficácia da terapia em diferentes contextos clínicos (46).

Segundo Moro et.al., e Segarra-Vidal et.al., destacam uma grande dificuldade na comparação de trabalhos utilizando aPDT, devido à falta de padronização de protocolos clínicos. Essa variabilidade inclui diferenças em comprimentos de ondas, fontes de luz, tempos de irradiação e diferentes concentrações dos FS. Essa ausência de um protocolo clínico uniforme para a aPDT no tratamento das doenças periodontais gera uma heterogeneidade significativa entre os trabalhos que utilizam os FS fenotiazinas, apresentando uma diferença de 71 a 94%. Por este motivo, essa limitação dificulta a comparação de dados com precisão e interpretação real dos benefícios da aPDT para esses pacientes (37,47) .

Os estudos de Setiawatie et.al., e Najafi et.al., consideram a aPDT para inativação de *A. actinomycetemcomitans* eficaz. Os dois autores utilizaram o FS indocianina verde e curcumina, respectivamente. Em contrates, Tortamano et. al., utilizando o FS azul de metileno em veículo aquoso e em SDS não apresentou essa efetividade frente á essas bactérias. Há uma grande divergência entre os estudos clínicos e *in vitro* sobre a terapia fotodinâmica antimicrobiana, ressaltando a importância da padronização do tipo de FS e dos parâmetros de irradiação (9,14,16).

Com a utilização do FS azul de metileno na aPDT para inativação do biofilme *A. actinomycetemcomitans*, observou-se que não houve diferença estatística significante na morte microbiana entre o tempo de 1 e 3 min de irradiação, no entanto, com 5 min, demonstrando-se uma redução considerável, apresentando uma morte de 99,85%. Esses resultados são comparáveis aos do presente estudo, pois apresentou uma morte microbiana nesta espécie bacteriana de 99,99% durante a irradiação de 5 min. Porém ao comparar a irradiação de 3 min, neste estudo presente obtivemos uma queda microbiana de 2 logs e o corante de escolha foi o FS Butil azul de toluidina O (BuTBO). Com essas comparações podemos observar uma eficácia do BuTBO em comparação ao AM (9,35).

Estudos comparando a aPDT com a utilização do azul de metileno, azul de toluidina O e butil azul de toluidina O no tratamento das doenças periodontais indicaram que este último resultou em uma menor extensão do processo inflamatório e menor perda óssea alveolar (45).

A utilização do FS da família das fenotiazinas em ensaios clínicos utilizando altas concentrações e acima de 100 µM, apresentam mais dímeros que monômeros em solução

aquosa. A dimerização destes corantes podem prejudicar a eficácia dos mesmos, sendo assim necessário um fotossensibilizador mais eficaz ou um método melhor ou até mesmo um veículo melhor para elevar o efeito antimicrobiano e consequentemente melhorar os efeitos clínicos fornecidos pela aPDT (37,48).

Com essa necessidade de melhoras clínicas, foi criado um fotossensibilizador da família das fenotiazinas, o BuTBO. Este FS é uma modificação físico-química do ATO, e é um corante recém-sintetizado. Foi formulado com o intuito de melhorar a ação antimicrobiana dos corantes. Com essas modificações na sua estrutura molecular foi possível observar aumentos no comprimento de onda de absorção visível, diminuição do ombro de comprimento de onda inferior ao pico principal de absorção na região vermelha com o aumento do tamanho do grupo aquil em C-2, lipofilicidade com o aumento do teor de hidrocarbonetos, diminuição da agregação de derivados com substituintes mais volumosos e produção de oxigênio singlete. Mesmo assim ainda é recomendável estudos adicionais para explorar diferentes combinações de tempo de irradiação e dosagens de BuTBO, visando aprimorar ainda mais os resultados terapêuticos (43).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica (aPDT) combinada com o fotossensibilizador BuTBO é eficaz na redução da carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*. O tempo de irradiação é um fator muito importante para maximizar a eficácia do tratamento, e com 3 e 5 min de irradiação obtivemos resultados significativos, sendo que 3 mim reduziu 2 logs e 5 min reduziu 4 logs da concentração original.

Dessa forma, o BuTBO se destaca como um fotossensibilizador promissor no combate a infecções, e demonstra um potencial significativo para futuras aplicações clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018;89(March):S74–84.
2. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. J Periodontal Implant Sci. 2014;44(2):79–84.
3. STEFFENS JP, MARCANTONIO RAC. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. Rev Odontol da UNESP. 2018;47(4):189–97.
4. Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on Streptococcus mutans is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2017;19(November 2016):1–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.04.004
5. Grzech-Leśniak K, Matys J, Dominiak M. Comparison of the clinical and microbiological effects of antibiotic therapy in periodontal pockets following laser treatment: An in vivo study. Adv Clin Exp Med. 2018;27(9):1263–70.
6. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MPA, et al. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: A short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. Photomed Laser Surg. 2011;29(12):835–44.
7. FELIPE ME, Chomyszyn-gajeswska M, Fischer RG. Efeito do tratamento periodontal em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 The effect of periodontal treatment in patients with diabetes mellitus type 2. Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ. 2013;(01):84–91.
8. Anselmo GG, Tortamano ACAC, Goncalves MLL, Leal-Rossi A, Godoy-Miranda BA, Oliveira MRC, et al. The in Vitro antimicrobial efficacy of PDT against

periodontopathogenic bacteria. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2015;16(1):462–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.012

9. Tortamano ACAC, Anselmo GG, Kassa CT, Godoy-Miranda B, Pavani C, Kato IT, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020;31.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28(1):12–55.
11. Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005;32(SUPPL. 6):7–15.
12. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol. 1994;176(8):2137–42.
13. Moore WEC, Moore LLVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. Periodontology [Internet]. 2000;5(1):66–77. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00019.x/full
14. Setiawatie EM, Astuti SD, Zaidan AH, Lestari VP, Astuti SD, Peeridogaheh H, et al. The impact of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm-derived effectors following antimicrobial photodynamic therapy on cytokine production in human gingival fibroblasts. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2020;32(Special Issue 1):1–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102055
15. Setiawatie EM, Astuti SD, Zaidan AH. An in vitro Anti-microbial Photodynamic Therapy (aPDT) with Blue LEDs to Activate Chlorophylls of Alfalfa Medicago sativa L on Aggregatibacter actinomycetemcomitans. J Int Dent Med Res. 2016;9(2):118–25.
16. Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Fard MJK, Bahador A. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on Aggregatibacter actinomycetemcomitans. J Lasers Med Sci [Internet]. 2016;7(1):21–5. Available from: http://dx.doi.org/10.15171/jlms.2016.05
17. Sayar F, Chiniforush N, Bahador A, Etemadi A, Akhondi N, Azimi C. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for elimination of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm on Laser-Lok titanium discs. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2019;27:462–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.012

18. Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhauf U, Dannewitz B, Dommisch H, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. Clin Oral Investig. 2019;23(7):3073–85.
19. Boia S, Stratul ŞI, Boariu M, Ursoniu S, Goţia SL, Boia ER, et al. Evaluation of antioxidant capacity and clinical assessment of patients with chronic periodontitis treated with non-surgical periodontal therapy and adjunctive systemic antibiotherapy. Rom J Morphol Embryol. 2018;59(4):1107–13.
20. Zandbergen D, Slot DE, Niederman R, Van der Weijden FA. The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root planing alone in treating periodontitis: =a systematic review=. BMC Oral Health [Internet]. 2016;16(1):1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12903-015-0123-6
21. Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. Periodontol 2000. 2015;67(1):131–86.
22. Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. J Periodontal Res. 2015;50(3):294–314.
23. Takiy R, Tiemi C, Andreotti C. Alerta à resistência antibiótica em periodontia. 2007;36(4):299–304.
24. Oliveira CL de, Santos K de S, Fernandes Neto J de A, Batista ALA, Medeiros CLSG de, Catão MHC de V. A eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal não cirúrgico. Arch Heal Investig. 2017;6(6).
25. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A. Can antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) enhance the endodontic treatment? J Lasers Med Sci [Internet]. 2016;7(2):76–85. Available from: http://dx.doi.org/10.15171/jlms.2016.14
26. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. Int J Mol Sci. 2015;16(9):20523–59.
27. Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, Grisi MFM, Taba M, Souza SLS, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: Results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. J Clin Periodontol. 2016;43(2):147–55.

28. Dias LLR, Guerreiro JC, Gandini JC, Grolli K, Bruschi ML, Ribeiro MG. Terapia fotodinamica como adjuvante no tratamento da doença periodontal em equinos. Arq Bras Med Vet e Zootec. 2020;72(5):1599–608.
29. Peron D, Bergamo A, Prates R, Vieira SS, de Tarso Camillo de Carvalho P, Serra AJ. Photodynamic antimicrobial chemotherapy has an overt killing effect on periodontal pathogens? A systematic review of experimental studies. Lasers Med Sci. 2019;34(8):1527–34.
30. Alvarenga LH, Gomes AC, Carribeiro P, Godoy-Miranda B, Noschese G, Simões Ribeiro M, et al. Parameters for antimicrobial photodynamic therapy on periodontal pocket—Randomized clinical trial. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2019;27(May):132–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.035
31. Leal L, Fundo UDP. Microbiota Das Infecções Endo-Periodontais : 2019;(February).
32. Alves da Collina G, Freire F, da Silva Barbosa V, Bento Correa C, Reis Nascimento H, Ratto Tempestini Horliana AC, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2020;29(November 2019):101612. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101612
33. Prates RA, Silva EG, Yamada AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. Laser Phys. 2009;19(5):1038–44.
34. Pan H, Wang D, Zhang F. In vitro antimicrobial effect of curcumin-based photodynamic therapy on Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2020;32:102055. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102055
35. Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015;12(1):131–5.
36. Street CN, Pedigo LA, Loebel NG. Energy Dose Parameters Affect Antimicrobial Photodynamic Therapy–Mediated Eradication of Periopathogenic Biofilm and Planktonic Cultures. Photomed Laser Surg. 2010;28:S-61-S-66.
37. Moro MG, de Carvalho VF, Godoy-Miranda BA, Kassa CT, Horliana ACRT, Prates RA.

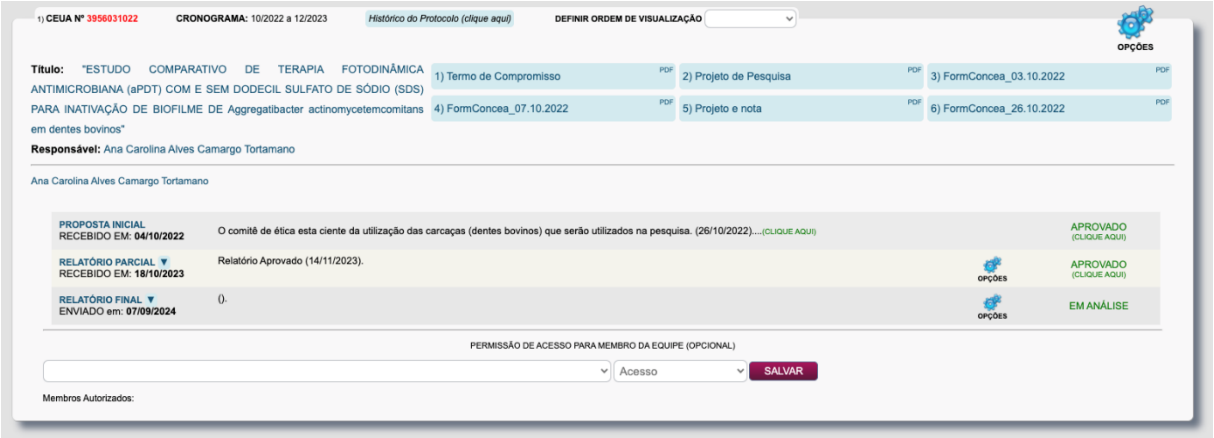
Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. Lasers Med Sci. 2021;36(8):1573–90.

38. Life QOF, Of S, Of U. Photodynamic Therapy with methylene blue on the healing and repair of induced ulcers in rodent models Taynara Camille Guilherme Lima 1. 2020;(September).
39. Nuñez SC, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Junqueira HC, Maciel C, Coutinho-Neto MD, et al. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. J Photochem Photobiol B Biol. 2015;150:31–7.
40. Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: The use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. J Clin Periodontol. 2008;35(SUPPL. 8):45–66.
41. Daniel Harris, BA, Lynn McNicoll, MD, Gary Epstein-Lubow, MD, and Kali S. Thomas P, Chirag M Lakhani1, Braden T Tierney1, 2, Arjun K Manrai1, 3, Jian Yang4, 5, Peter M Visscher#4, 5,*, and Chirag J Patel#1 1Department. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. Physiol Behav. 2017;176(1):139–48.
42. Da Collina GA, Freire F, Santos TP da C, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat Candida albicans infections using photodynamic therapy. Photochem Photobiol Sci. 2018;17(10):1355–64.
43. Wainwright M, O'Kane C, Rawthore S. Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. J Photochem Photobiol B Biol. 2016;160:68–71.
44. Anselmo GG, Tortamano ACAC, Goncalves MLL, Leal-Rossi A, Godoy-Miranda BA, Oliveira MRC, et al. Antimicrobial photodynamic chemotherapy mediated by PapaMBlue on chronic periodontal disease: Study protocol for a randomized, blind, controlled trial. Med (United States). 2020;99(6).
45. Theodoro LH, da Rocha TE, Wainwright M, Nuernberg MAA, Ervolino E, Souza EQM, et al. Comparative effects of different phenothiazine photosensitizers on experimental periodontitis treatment. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021;34.
46. De Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. Photomed Laser Surg. 2017;35(5):239–45.

47. Segarra-Vidal M, Guerra-Ojeda S, Vallés LS, López-Roldán A, Mauricio MD, Aldasoro M, et al. Effects of photodynamic therapy in periodontal treatment: A randomized, controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2017;44(9):915–25.

48. Engel E, Schraml R, Maisch T, Kobuch K, Konig B, Szeimies RM, et al. Light-induced decomposition of indocyanine green. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(5):1777–83.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



1) CEUA Nº 3956031022 CRONOGRAMA: 10/2022 a 12/2023 Histórico do Protocolo (clique aqui) DEFINIR ORDEM DE VISUALIZAÇÃO

OPÇÕES

Título: "ESTUDO COMPARATIVO DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM E SEM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) PARA INATIVAÇÃO DE BIOFILME DE Aggregatibacter actinomycetemcomitans em dentes bovinos"

1) Termo de Compromisso PDF | 2) Projeto de Pesquisa PDF | 3) FormConcea_03.10.2022 PDF

4) FormConcea_07.10.2022 PDF | 5) Projeto e nota PDF | 6) FormConcea_26.10.2022 PDF

Responsável: Ana Carolina Alves Camargo Tortamano

Ana Carolina Alves Camargo Tortamano

PROPOSTA INICIAL RECEBIDO EM: 04/10/2022	O comitê de ética esta ciente da utilização das carcaças (dentes bovinos) que serão utilizados na pesquisa. (26/10/2022)...(CLIQUE AQUI)		APROVADO (CLIQUE AQUI)
RELATÓRIO PARCIAL ▼ RECEBIDO EM: 18/10/2023	Relatório Aprovado (14/11/2023).	OPÇÕES	APROVADO (CLIQUE AQUI)
RELATÓRIO FINAL ▼ ENVIADO em: 07/09/2024	().	OPÇÕES	EM ANÁLISE

PERMISSÃO DE ACESSO PARA MEMBRO DA EQUIPE (OPCIONAL)

Acesso SALVAR

Membros Autorizados:

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

Universidade Nove de Julho
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO COMPARATIVO DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM E SEM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) PARA INATIVAÇÃO DE BIOFILME DE Aggregatibacter actinomycetemcomitans em dentes bovinos", protocolada sob o CEUA nº 3956031022 (ID 000330), sob a responsabilidade de **Ana Carolina Alves Camargo Tortamano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 26/10/2022.

We certify that the proposal "COMPARATIVE STUDY OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY (aPDT) WITH AND WITHOUT SODIUM DODECYL SULFATE (SDS) FOR INACTIVATION OF BIOFILM OF Aggregatibacter actinomycetemcomitans in bovine teeth", utilizing 24 Bovine carcass (males and females), protocol number CEUA 3956031022 (ID 000330), under the responsibility of **Ana Carolina Alves Camargo Tortamano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 10/26/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2022 a 12/2023 Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Amostras biológicas estocadas
Espécie: carcaça de bovinos sexo: Machos e Fêmeas idade: 2 a 6 anos Quantidade: 24
Linhagem: não se aplica Peso: 100 a 200 g

São Paulo, 08 de outubro de 2024

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho