



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS NUCLEARES

**Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia
fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus
actinomycetemcomitans* - um estudo *in-vitro*.**

Renato Araújo Prates

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre
Profissional em *Laser* em
Odontologia;

Orientadora: Dra. Martha Simões Ribeiro
CO-Orientadora: Dra. Sheila Gouw-Soares

**São Paulo
2005**



Dedicatória

*Dedico este trabalho a meus
Pais, a Gisele, aos amigos e colegas da
Especialização em Periodontia da
ABO-MG, e a Deus.*

*"Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe
provando o contrário"*

Albert Einstein

Agradecimentos

Obrigado à Dra. Silvana Cai, que me acolheu em seu laboratório e me ensinou microbiologia. Você foi essencial neste nosso trabalho.

Obrigado Dra. Sheila Gouw-Soares, Dra. Denise Zezell, Dr. Lívio Barros da Silveira, Dr. Gerdal Roberto de Sousa, ao Aécio Massayoshi Yamada Jr., Silvia Cristina Nunes, Agnaldo Silva Garcez, Maria Cristina Eiko Hashimoto, Fernanda Youssef, Paola Racy de Micheli, Cynthia França, Matheus Araújo, Letícia Lang, Daniela de Fátima Teixeira Silva, Luis Cláudio Suzuki e a todos os colegas que me abrigaram em São Paulo, a todo grupo de pesquisa do CLA, em especial aos alunos da Dra. Denise Zezell, e a todos os colegas da quinta turma do MPLO. Obrigado pela ajuda, incentivo, críticas, quebra-galhos, auxílio no laboratório, pelas horas de discussão e toda energia dispensada neste trabalho.

Obrigado aos amigos Henrique Roscoe, Danielle Curi, Júnia Tomé Cateb, Alexandre Cateb, e Márcia Rodrigues que sempre acreditam em mim.

Obrigado à Gisele Alcântara, Robéria Costa, Luiz Carlos Alcântara e Vanessa Alcântara pela amizade e compreensão.

Obrigado especial à Dra. Martha Simões Ribeiro, que além de orientadora, foi paciente e amiga, neste difícil caminho de crescimento científico e pessoal. Obrigado também a sua família, que muitas vezes foi privada de sua companhia em detrimento do auxílio ao nosso trabalho.

**Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia
fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus
actinomycetemcomitans* - um estudo *in-vitro*.**

Renato Araújo Prates

Resumo

A doença periodontal tem como fator etiológico os microorganismos do biofilme sub gengival na superfície dos dentes. É uma doença infecciosa e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ocupa um papel importante na ecologia das periodontites localizadas e generalizadas. Como alternativa para o uso de antibióticos, a terapia fotodinâmica (PDT) se apresenta como um método para auxílio dos pacientes portadores desta doença. É um tratamento local que não causa resistência microbiana e se baseia na utilização de um corante e luz para promoção de morte bacteriana na presença de um meio rico em oxigênio. O objetivo deste estudo foi investigar a habilidade do verde malaquita (VM) associado à irradiação *laser* em baixa intensidade em matar o *A. actinomycetemcomitans* em suspensão, bem como investigar por espectroscopia de absorção óptica, a degradação do VM após a irradiação, e as alterações que ocorrem no sistema irradiado antes e após a PDT. Culturas de *A. actinomycetemcomitans* foram irradiadas por um *laser* diodo GaAlAs vermelho, emitindo em 660 nm com 30 mW de potência, na presença ou ausência do VM. Um grupo foi exposto ao VM (0,01% p/v) sozinho, durante 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Na presença do VM, dois tempos de exposição foram usados: 3 e 5 minutos, levando a uma fluência de 5,4 e 9 J/cm² respectivamente. O espectro de absorção da suspensão bacteriana após a irradiação foi obtido no espectrofotômetro Varian Cary-17. O *A. actinomycetemcomitans* pode ser morto pela irradiação *laser* vermelho em baixa intensidade na presença do corante VM. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas fluências. Somente a irradiação *laser* não foi capaz de danificar as células bacterianas. A absorção óptica mostrou que o VM se foto degrada nos dois tempos testados (3 e 5 minutos). Os resultados sugerem que o *A. actinomycetemcomitans* é foto sensibilizado e morto pela associação *laser* e VM, e este corante se foto degrada após a irradiação.

Malachite green as photosensitizer to photodynamic therapy: the bactericidal effect on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* -an *in vitro* study.

Renato Araújo Prates

Abstract

Periodontal disease has as etiologic factor the subgingival microorganism from bacterial biofilm on the teeth surface. It is an infection disease and the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is considered an important agent on the biofilm ecology in localized and generalized aggressive periodontitis. Instead using antibiotics, photodynamic therapy (PDT) is an alternative method to helps these patients. The treatment is local and does not cause bacterial resistance, PDT uses a dye and light to kill bacterial cells in an rich-oxigen enviromment. The aim of this study was to investigate the ability of the malachite green (MG) associated with a low power red laser to kill *A. actinomycetemcomitans* in suspension as well as to investigate MG photodegradation after PDT by optical absorption spectroscopy. Cultures of *A. actinomycetemcomitans* were treated in red laser light conditions using a GaAIAs diode laser emitting light at 660 nm, output power of 30 mW, in the presence or absence of malachite green. A group was used with exposure to MG alone (0.01% m/v) during 5 min. (pre-irradiation time) without laser exposure. In the presence of MG, two exposures times for laser irradiation were used: t= 3 min., corresponding to a fluence of 5.4 J/cm², and t = 5 min., corresponding to a fluence of 9 J/cm². Absorption spectra of the bacterial suspension, of the photosensitised bacterial suspension and of the bacterial suspension after laser irradiation were obtained in a Varian Cary 17 spectrophotometer. *A. actinomycetemcomitans* can be photoinactivated by low power red laser in the presence of MG. No statistically significant differences were observed between the two fluences used. Red laser alone and MG alone were not able to kill bacteria. Optical absorption showed that MG is photobleached after irradiation in both times tested (3 min. and 5 min.) These results suggest that *A. actinomycetemcomitans* can be photosensitized by malachite green and that the dye is photodegraded following laser irradiation.

SUMÁRIO

1.	Introdução	01
2.	Objetivos.....	04
3.	Revisão de Literatura	05
	3.1. Doença Periodontal e sua Etiologia	05
	3.2. Terapia Fotodinâmica.....	08
	3.3. O Verde malaquita.....	14
4.	Materiais e Métodos.....	15
	4.1 O experimento com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	15
	4.2 A Espectroscopia.....	20
	4.3 O <i>Laser</i>	22
5.	Resultados.....	23
	Discussão.....	29
	Conclusões.....	34
	Referências Bibliográficas.....	35

Lista de siglas e/ou abreviaturas

% -	porcentagem
μM -	micro molar
μL -	micro litro
$^{\circ}\text{C}$ -	grau Celsius
1mg/mL -	miligrama por mililitro
C- -	corante ausente
C+ -	corante presente
cm^2 -	centímetro quadrado
CO_2 -	dióxido de Carbono
DE -	densidade de Energia
DP -	densidade de Potência
He-Ne -	hélio-Neônio
ICB -	Instituto de Ciências Biomédicas
J -	joule
L- -	<i>laser</i> ausente
L+ -	<i>laser</i> presente
mL -	mililitro
mW -	mili watt
nm -	nanometro
P -	potência
PDT -	<i>photodynamic therapy</i>
PBS pH7,2-	sodium phosphate buffer
s -	Segundos

t-	tempo
λ -	comprimento de onda
TSA –	triptic soy agar
ufc –	unidade formadora de colônia
USP –	Universidade de São Paulo
VM –	verde malaquita
W –	watt

Lista de Figuras

Fig. 01-	Representação da estrutura química da molécula do verde malaquita	Pag. 20
Fig. 02-	Irradiação na parte inferior do tubo de ensaio sem verde malaquita na solução.	Pag. 16
Fig. 03-	Irradiação na parte inferior do tubo de ensaio com verde malaquita em solução, ilustrando a absorção do sistema contendo suspensão bacteriana e corante.	Pag. 17
Fig. 04 -	Colônias de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em TSA após o experimento no grupo PDT 3 minutos.	Pag. 18
Fig. 05 -	Esquema ilustrativo da seqüência do experimento.	Pag. 18
Fig. 06 -	CARY OLIS-17 Inc. (On-Line Instrument Systems, Inc. USA).	Pag. 20
Fig. 07 -	LASER UNIT (KONDORTECH, São Carlos-SP, Brasil).	Pag. 22
Fig.08 -	Número de células viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> para os grupos investigados.	Pag. 24

- Fig. 09 - Redução bacteriana atingida no experimento. Pag. 24
- Fig. 10 - Espectro de absorção do verde malaquita no espectro visível e representação do comprimento de onda. Pág. 26
- Fig. 11 - Comparação entre os espectros de absorção no ultravioleta da solução de verde malaquita com ou sem *A. actinomycetemcomitans*, antes e após a terapia fotodinâmica. Pág. 27
- Fig. 12 - Comparação da variação na espectroscopia dos diversos grupos testados no experimento e das alterações ocorridas na irradiação da suspensão de *A. actinomycetemcomitans* e verde malaquita 0,01%. Pág. 28
- Fig. 13 - Alteração na absorção da suspensão bacteriana com verde malaquita 0,01% em função do tempo, no comprimento de onda $\lambda=623\text{nm}$. Pag. 29

1- Introdução

A doença periodontal é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, levando à perda óssea e de ligamento periodontal. Resulta da interação de fatores dos microorganismos, do hospedeiro e ambientais e sua progressão está relacionada a fatores de risco como diabetes melito e tabagismo. Infecções localizadas ou generalizadas causadas por bactérias aparecem como a maior prevalência de doenças que acometem a cavidade oral, gerando uma situação problemática para os sistemas de Saúde Pública. A doença periodontal hoje representa uma importante complicação na saúde geral do indivíduo sendo relacionada a uma série de doenças sistêmicas como infarto agudo do miocárdio, bacteremias transitórias, endocardites bacterianas, nascimento de crianças de baixo peso, pneumonias por aspiração de partículas contaminadas, além de dificultar o controle metabólico em pacientes portadores de diabetes melito [1-3].

A doença periodontal é causada por microorganismos que colonizam a superfície dental acima ou abaixo da margem gengival. Apresenta-se com uma infecção resultante da formação de um biofilme e a maioria dos agentes etiológicos são membros da microbiota indígena. O uso de agentes antimicrobianos é restrito a casos de periodontite agressiva e refratária, e seu uso corriqueiro não se justifica como tratamento, visto que a grande maioria dos casos responde bem à terapia mecânica com raspagem e alisamento radicular. No entanto, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ocupa um papel ecológico importante nos quadros de periodontite agressiva localizada e generalizada, patologia inflamatória oral que contribui para perda precoce de dentes, sobretudo de adolescentes e adultos jovens. Este quadro patológico

ainda hoje se apresenta como um grande desafio para o periodontista, devido à capacidade deste microorganismo de colonizar tanto a parede dura quanto a parede mole da bolsa periodontal, necessitando freqüentemente do uso de antibióticos sistêmicos para solução dos casos [4-8].

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos promove a seleção natural de cepas bacterianas resistentes e deixa uma oportunidade para recombinação genética dos fatores de resistência e mutação. Isso pode ser interpretado como um dos maiores problemas para o século XXI, visto que a capacidade de adaptação destes seres é gigantesca e para cada medicamento colocado no mercado, em pouco tempo, surge uma cepa resistente [4, 5, 9].

Dentro deste cenário, surge a terapia fotodinâmica, que é uma forma de fototerapia baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos e ativação destas pela presença da luz. As células consideradas alvo da terapia serão coradas com o fotossensibilizador e irradiadas com luz. A molécula do fotossensibilizador passará para um estado mais excitado, e voltando ao estado mais estável, irá transferir esta energia para o sistema propiciando um efeito fotoquímico que normalmente leva a morte celular [10-15].

O verde malaquita é usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas. Possui afinidade à albumina no soro bovino e aos lipídios, ligando e sendo capaz de pigmentar bem o biofilme oral aderido à superfície dos elementos dentais. Esta pigmentação tem como finalidade auxiliar o exame periodontal, para quantificação profissional do biofilme levando a documentação do índice de placa bacteriana em cada sessão de tratamento periodontal. Também é

muito útil para mostrar ao paciente onde existe biofilme e como ele irá fazer a higiene oral, buscando remover os depósitos bacterianos aderidos aos seus dentes [16, 17].

Este corante apresenta uma banda de absorção óptica entre 500 e 700nm, tendo a habilidade de absorver a irradiação *laser* e, sendo assim, o propósito deste trabalho foi avaliar o efeito bactericida do verde malaquita associado à irradiação *laser* $\lambda=660\text{nm}$ sobre colônias de *A. actinomycetemcomitans* [18].

2- Objetivos

- Verificar o efeito bactericida *in vitro* da terapia fotodinâmica com o uso do corante verde malaquita associado à irradiação *laser* com $\lambda = 660\text{nm}$, no microorganismo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*;
- Investigar se o efeito bactericida em *A. actinomycetemcomitans* é dose-dependente;
- Investigar por medidas espectroscópicas, as alterações que ocorrem na absorção da suspensão de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* após o uso da terapia fotodinâmica.

3- Revisão de literatura

3.1 A doença periodontal e sua etiologia

A doença periodontal é causada por microorganismos, geralmente bactérias anaeróbias obrigatórias gram negativa, que colonizam a superfície dental acima ou abaixo da margem gengival [4].

Apresenta-se com uma infecção resultante da formação de um biofilme e a maioria dos agentes etiológicos são membros da microflora indígena. Sua evolução depende da interação de fatores microbianos, aos fatores de defesa do hospedeiro. Sua progressão está relacionada a fatores de risco como diabetes melito e tabagismo. O paciente portador de diabetes melito tem uma maior resposta inflamatória frente à infecção bacteriana [3, 19].

O tratamento periodontal é complexo e requer adaptações ecológicas e físicas, buscando a desorganização do biofilme através do uso de técnicas de escovação dental, utilização sistemática de fio-dental, tratamento clínico para remoção de depósitos mineralizados ou cálculos na raiz dental e correção dos defeitos ou seqüelas da doença, além inclusive, do uso de substâncias antimicrobianas. Algumas espécies bacterianas parecem estar relacionadas às condições de doença periodontal destrutiva. Espécies como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema* spp., têm sido associadas a doenças periodontais. Microorganismos como leveduras e vírus também têm sido associados às doenças periodontais [6, 20, 21].

A doença periodontal afeta os tecidos de suporte dos dentes levando a perda óssea e do ligamento periodontal, além de colocar em risco a função do elemento dental. Esta infecção representa também forte risco sistêmico, pois a liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea pode desencadear uma série de respostas pelo organismo. Alterações como infarto agudo do miocárdio e rompimento de trombos vasculares vêm sendo pesquisados e fortemente relacionados a infecções periodontais [2].

Apresentada em 1999, durante o workshop internacional para a classificação de doenças periodontais, foi proposta a seguinte sistemática para diagnosticar e classificar os processos patológicos que afetam o periodonto. A Academia Americana de Periodontologia postulou a seguinte classificação [22].

I-Doenças gengivais

A-Doenças gengivais induzidas por placa dental

B-Lesões gengivais não induzidas por placa

II-Periodontites crônicas

A-Localizadas

B-Generalizadas

III-Periodontites Agressivas

A-Localizadas

B-Generalizadas

Como orientação geral, a extensão pode ser localizada quando for menor ou igual a 30% dos sítios envolvidos e, generalizada quando for maior que 30% dos sítios envolvidos. A severidade pode ser caracterizada com base na quantidade de perda de inserção clínica, da seguinte maneira [22].

- Leve (de 1 a 2 mm de perda de inserção clínica).

- Moderada de (3 a 4 mm de perda de inserção clínica) e
- Severa (igual ou maior que 5 mm de perda de inserção clínica).

O uso de agentes antimicrobianos é restrito a casos de periodontite agressiva, e seu uso corriqueiro não se justifica como tratamento, visto que a grande maioria dos casos responde bem a terapia mecânica com raspagem e alisamento radicular [5].

O *A. actinomycetemcomitans* é uma bactéria que apresenta uma morfologia de coco bacilo com coloração negativa para técnica de gram, sacarolítico e ocupa um papel ecológico importante nos quadros de periodontites agressiva e crônica, patologia inflamatória oral que contribui para perda precoce de dentes, sobretudo em adolescentes e adultos. Este quadro patológico, ainda hoje, apresenta grandes dificuldades de resoluções terapêuticas devido à capacidade deste microorganismo de colonizar tanto a parede mole quanto a parede dura da bolsa periodontal, necessitando freqüentemente do uso de antibióticos sistêmicos para solução dos casos [5, 6].

3.2 A Terapia Fotodinâmica (PDT)

A PDT é uma modalidade de fototerapia onde três fatores atuam concomitantemente. O fotossensibilizador, uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem a droga nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico testado [23].

A terapia fotodinâmica tem seu início quando a molécula do fotossensibilizador absorve a luz que a irradia e sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, porém menos estável, chamado estado singleto. Devido a grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo para seu estado inicial. Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato de várias formas: por meio de fluorescência, onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons, por conversão interna ou também pode passar a um nível de energia intermediário. Este nível intermediário chamado estado tripleto, entre o estado fundamental e o estado singleto, apresenta um tempo de vida um pouco mais longo. Este decaimento energético pode excitar outros componentes do meio, interagindo bem com a molécula de oxigênio e gerando rapidamente formas tóxicas à célula, como peróxidos, radicais hidroxila, íons superóxidos e oxigênio singleto, este último sendo apontado como maior causador de dano celular[24].

Uma estreita relação entre absorção do corante e comprimento de onda utilizado deve ser observada na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros é estabelecida. A presença do fotossensibilizador e da irradiação por fonte de luz apropriada

geram o efeito iniciador da terapia fotodinâmica. A banda de absorção do fotossensibilizador deve ser ressonante com a radiação emitida, absorvendo bem o comprimento de onda emitido [10].

Há mais de 4.000 anos, os egípcios deram início a essa terapia, através da ingestão de plantas contendo os psoralenos, e exposição à luz solar, para tratar doenças como o vitiligo. Entretanto, a técnica começou a ser empregada com sistemática científica apenas em 1900, quando Raab descreveu a ação do corante acridina e luz solar sobre *Paramecia*, demonstrando que este organismo unicelular pode morrer sob essas condições. Em 1903, Trappeiner utilizou a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para o tratamento de um câncer de pele. Em 1913 Meyer-Betz fez uma auto-injeção de 200 mg do que ele acreditava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses. Policard, em 1925, estudou porfirinas objetivando a produção de efeitos fototóxicos em tecidos, principalmente em tumores malignos. A história da chamada primeira geração de drogas para a terapia fotodinâmica, à base de derivados hematoporfirínicos, começou com Schwartz no início da década de 50. Ele mostrou que nos experimentos de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, pois esse composto é facilmente eliminado do organismo, mas na realidade tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento da mesma. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou o preparado de hematoporfirina D) e Lipson, sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo preferencial deles em tumores, implantados em camundongos e ratos e observou que a incidência de luz proporcionava

regressão da doença. Como resultado desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama usando hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor, marcando assim, o início da terapia fotodinâmica como terapia clínica para câncer [25, 26].

Em 1973, pesquisas investigaram a ação da terapia fotodinâmica na inativação do herpes vírus tipo-1, e mostraram que em alguns casos, o curso das lesões foi interrompido [12].

A partir da década de 70, várias preparações de derivados porfirínicos começaram a ser testadas para uso na terapia fotodinâmica, culminando com o desenvolvimento do *Photofrin*® II (refinamento do hematoporfirina D). Posteriormente, no fim da década de 80, através de purificações e otimizações do preparado anterior, por processos de liofilização, culminou no desenvolvimento do medicamento *Photofrin*® [26].

O potencial para utilização da terapia fotodinâmica em bactérias orais começou a ser investigado na década de 90 quando Dobson & Wilson demonstraram bons resultados de redução bacteriana utilizando o *laser* de He-Ne (Hélio-Neônio), $\lambda=632,8$ nm e 7,3mW de potência, associado aos fotossensibilizadores azul de toluidina (TBO), azul de metileno (MB), ftalocianina e hematoporfirinas. Foram testadas as bactérias *Streptococcus sanguis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Foram utilizadas bactérias do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. Amostras da placa subgengival foram expostas à luz, na presença e na ausência do corante azul de toluidina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os autores concluíram que a combinação *laser*

corante alcançou uma significativa redução bacteriana, sendo que a média de redução foi de 91,1% nas bactérias aeróbias, 96,9% nas anaeróbias, 100% nas pigmentadas anaeróbias e 94,4% para os *Streptococcus*. Entretanto, a redução bacteriana não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do *laser*. Isto sugere que o *laser* em baixa intensidade associado ao corante apropriado pode ser efetivo como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico em inflamações periodontais, pois, três dos principais responsáveis pela etiologia da doença periodontal podem ser mortos por esta modalidade de tratamento [15].

A terapia fotodinâmica foi utilizada em suspensões da bactéria *Helicobacter pylori* juntamente com os fotossensibilizadores TBO, MB, fitalocianina, derivados de hematoporfirina e ácido aminolevulínico (ALA). A fonte de luz utilizada variou o comprimento de onda para cada fotossensibilizador, de forma a ser compatível com a absorção. Para o TBO, ALA e hematoporfirina foi utilizado $\lambda=630$ nm, para o MB $\lambda=660$ nm, e para a fitalocianina $\lambda=675$ nm. Foi observada a fotossensibilização letal e inibição do crescimento deste microorganismo. Em contrapartida, na ausência dos corantes, a irradiação laser não se mostrou eficiente contra a bactéria estudada. A PDT com MB apresentou uma grande atividade bactericida reduzindo em 99,9% a viabilidade dos espécimes bacterianos, enquanto o TBO apresentou 90% de redução destes microorganismos. Os outros fotossensibilizadores foram ineficientes com os parâmetros utilizados neste experimento [12].

O *Staphylococcus aureus* pode ser eliminado *in vivo* pela PDT e foi observada uma ação antimicrobiana seletiva e sem desenvolvimento de resistência bacteriana à técnica empregada [27].

A sensibilidade do *S. aureus* também foi testada com terapia fotodinâmica na presença do corante isotiocianato de verde malaquita, apresentando um efeito bactericida potente frente esta modalidade de tratamento. O isotiocianato de verde malaquita é uma molécula com forma estrutural semelhante ao verde malaquita convencional, porém com um grupo S=C=N no lugar de um N(CH₃)₂. Isso leva a uma ligação tanto com a parte protéica, como com a porção lipídica da membrana celular bacteriana [17].

Associando o corante TBO (1µg/mL) a um laser diodo com 100mW de potência e comprimento de onda em 630 nm, sobre *P. gingivalis*, microorganismo encontrado em quadros de doença periodontal, que foram inoculados em molares superiores de ratos, Kömerik e colaboradores não encontraram após o tratamento espécimes viáveis do microorganismo em todas as doses aplicadas, além de ser observado um decréscimo de perda óssea nos grupos irradiados quando comparados ao controle não irradiado. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica pode ser usada como procedimento alternativo na prevenção da doença periodontal [11].

Estudos mostram que a terapia fotodinâmica também pode ser utilizada com fontes de luz convencionais e relataram um efeito bactericida eficiente utilizando lâmpada de xenônio associado a filtros na região do vermelho. O fotosensibilizador utilizado foi o azul de toluidina agindo sobre suspensão da bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Uma grande redução foi observada quanto se utilizou a dose de 2,2J/cm² e um aumento da dose para 5,63J/cm² elevou esta redução [28].

Estudo recente demonstrou uma resistência do *A. actinomycetemcomitans* aos tratamentos com terapia fotodinâmica, mostrando uma redução

insignificante em morte celular quando comparado a outras bactérias periodontopatogênicas, principalmente às produtoras de pigmentos negros [29].

3.3 - O verde malaquita

O verde malaquita é um corante usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme oral aderido aos elementos dentais[6].

A molécula deste corante também apresenta afinidade com a albumina no soro bovino e lipídios, incluindo substâncias com formula estrutural similar a lipídios [17].

Este corante apresenta uma banda de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético. Sua molécula é catiônica e pertence à família dos trifenilmetanos com três anéis benzênicos, conforme ilustrado na fig. 1, Sua fórmula química é representada por $C_{23}H_{25}N_2$ [17].

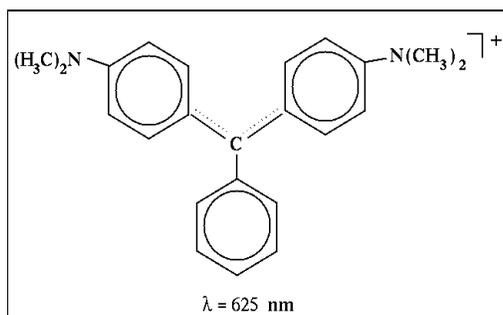


Fig. 1 - Representação da estrutura química da molécula do verde malaquita

4- Materiais e métodos

4.1– O experimento com *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Foram utilizados *A. actinomycetemcomitans* obtidos do estoques do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo (USP). A amostra, isolada de pacientes portadores de periodontite crônica, foi cultivada em placas de petri contendo ágar soja tripticaseína (TSA), e incubados em condições de microaerofilia, a 37°C, por 48 horas [30].

Foi realizado teste de catalase, análise morfológica da colônia e teste morfotintorial para confirmação presuntiva da espécie [30].

Após 48 h de crescimento, as bactérias foram colhidas por meio de raspagem das placas e diluídas em 10 mL de solução tampão de PBS (pH 7,2) até conseguir a turvação na escala 0,5 de Mc Farland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ ufc (unidades formadoras de colônias) por mililitro. Alíquotas de 900µL desta solução foram depositadas em cinco tubos de ensaio previamente identificados conforme a divisão dos grupos:

Grupo A: Controle;

Grupo B: somente irradiação com *laser* por 5 min;

Grupo C: somente corante verde malaquita por 5 minutos (tempo de pré-irradiação);

Grupo D: PDT3 (verde malaquita mais irradiação laser por 3 minutos);

Grupo E: PDT5 (verde malaquita mais irradiação laser por 5 minutos).

Aos grupos C, D e E foi adicionado um volume de 100 μ L de corante verde malaquita na concentração de 0,1% chegando a uma concentração final de 0,01% (m/V). Com essa diluição, o número estimado de ufc's passou de 1,5x10⁸ para 1,35x10⁸ tanto nos grupos C D e E, quanto no A e B, que receberam o mesmo volume de solução tampão PBS (pH7,2).

A irradiação *laser* foi feita na parte inferior do tubo, conforme figuras 2 e 3, no sentido de baixo para cima, de forma que o feixe percorresse o interior do líquido dentro do tubo de ensaio [31].



Fig. 2 - Irradiação na parte inferior do tubo de ensaio sem verde malaquita na solução.



Fig. 3 - Irradiação na parte inferior do tubo de ensaio com verde malaquita em solução, ilustrando a absorção do sistema contendo suspensão bacteriana e corante.

Após realizar os procedimentos de irradiação, foi iniciado o processo de diluições seriadas em uma concentração de $1,35 \times 10^8$ ufc's/mL. Este processo de diluições seriadas é empregado para diminuir a concentração de ufc, tornando viável a contagem na placa de Petri.

As placas de Petri já semeadas com $1,35 \times 10^4$ ufc foram encaminhadas para a estufa bacteriológica com temperatura a 37°C e encubadas por mais 48 horas em atmosfera rica em dióxido de carbono (5-10% CO_2) pelo método da chama de vela [30].

Passadas 48 h, as placas foram analisadas por meio de contagem das ufc conforme ilustrado na fig. 4.



Fig. 4 - Colônias de *A. actinomycetemcomitans* em TSA após o experimento no grupo PDT 3 minutos.

As ufc encontradas na placa de Petri foram multiplicado pelo fator de diluição e após estas operações matemáticas, podemos então relacionar os resultados, comparando-os com o máximo de bactérias irradiadas, que foi de $1,35 \times 10^8$ ufc/mL. A fig. 5 apresenta um esquema representativo da seqüência do experimento.

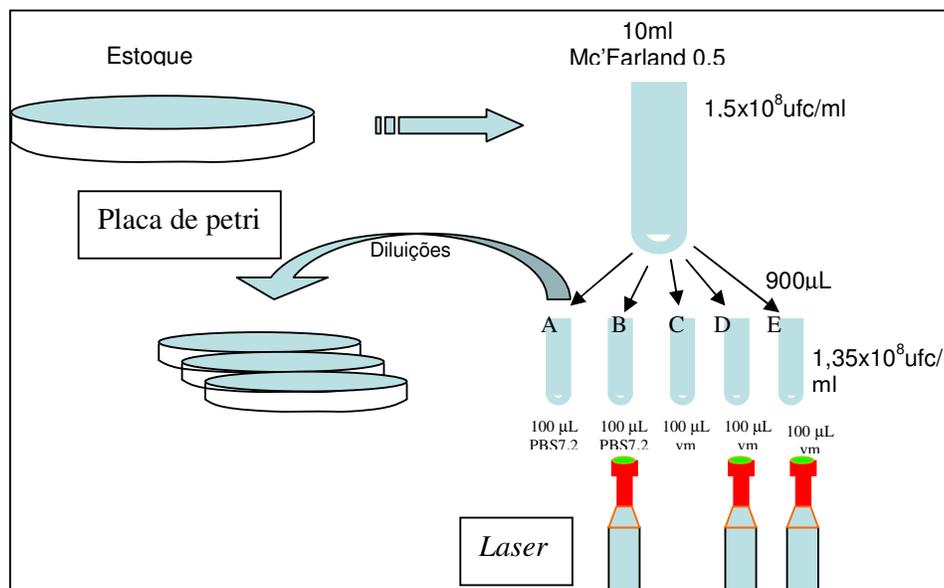


Fig.- 5 Esquema ilustrativo da seqüência do experimento

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste t–student. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Este experimento foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Silvana Cai no Laboratório de Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

4.2 - A espectroscopia

O espectro de absorção do verde malaquita (Synth Produtos Para Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,01% (massa/volume) ou $M = 317,4\mu\text{M}$ foi obtido em um espectrofotômetro CARY OLIS-17 Inc. (On-Line Instrument Systems, Inc. USA) utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O equipamento é ilustrado na fig. 6.



Fig. 6 - CARY OLIS-17 Inc. (On-Line Instrument Systems, Inc. USA)

A solução do corante verde malaquita foi depositada em cubeta de quartzo de 1 cm para avaliação do espectro de absorção na região visível do espectro eletromagnético. O equipamento incide um feixe luminoso na solução do corante, e através de um sensor, lê o resultado da absorção. O sinal luminoso residual é captado e encaminhado a um *software* (OLIS-17) para gerar um gráfico que apresenta o comprimento de onda (nm) no eixo X e a absorção (u.a.) no eixo Y. Varreu-se o espectro eletromagnético na região do

visível, entre 400 nm e 700 nm para observação das bandas de absorção do corante verde malaquita.

Dentro da região do ultravioleta foram medidas as características e alterações na absorção, com ou sem bactéria, e antes e após a terapia fotodinâmica. Nesta situação foi utilizada cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico. A concentração do corante e a quantidade de bactérias por mL foram padronizadas acompanhando os parâmetros utilizados neste estudo.

Foram procedidas quatro leituras, sendo a primeira com a suspensão contendo células bacterianas, e a segunda com o corante verde malaquita em solução sem bactérias. A terceira leitura foi realizada na suspensão bacteriana associada ao verde malaquita, com concentração final de 0,01% respeitando-se o tempo de pré-irradiação de 5 minutos. A quarta leitura foi realizada na mesma amostra, após irradiação por 5 minutos da suspensão. Antes de cada leitura, a suspensão de *A. actinomycetemcomitans* foi agitada para homogeneização e a temperatura na sala do espectrofotômetro foi mantida em 25°C durante todo o experimento.

4.3 - O equipamento *laser*

O equipamento utilizado foi o *LASER UNIT* (KONDORTECH, São Carlos-SP, Brasil) contendo como meio ativo um diodo de GaAlAs, emitindo em 660 nm com 30 mW de potência (fig. 7). A área irradiada foi de 1 cm², correspondendo a densidades de energia de 5.4 J/cm² ($\Delta t = 3$ min) e 9 J/cm² ($\Delta t = 5$ min).



Fig. 7 - LASER UNIT (KONDORTECH, São Carlos-SP, Brasil)

5- Resultados

Foi possível observar a redução no número de ufc nos grupos testados com terapia fotodinâmica.

O grupo A, referente ao controle positivo, não apresentou diminuição significativa demonstrando que as células estavam viáveis. Este resultado também foi observado nos grupos B e C, somente *laser* e somente verde malaquita 0,01%, respectivamente, mostrando que apenas estas variáveis também não alteram a viabilidade dos espécimes testados. Em contrapartida, os grupos testados com terapia fotodinâmica com densidades de energia de 5,4 J/cm² ($\Delta t = 3$ min) e 9 J/cm² ($\Delta t = 5$ min), D e E, respectivamente, mostraram-se sensíveis à terapia proposta, apresentando um número bem menos expressivo no crescimento bacteriano. Utilizando-se doses de 5,4 J/cm² ou 9 J/cm² foi possível observar redução significativa ($p < 0,05$) de *A. actinomycetemcomitans* em relação ao número inicial de ufc.

A redução bacteriana, em média, foi de 97,4% no grupo testado com terapia fotodinâmica durante 3 minutos (D= 5,4 J/cm²) e 99,9% (D= 9 J/cm²) para o grupo testado com 5 minutos, como mostrado nas figuras 8 e 9. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes comparando-se as duas doses utilizadas, no entanto entre os grupos PDT e os grupos controle, somente irradiados com *laser* e somente pigmentados com o verde malaquita 0,01%, não houve diferença significativa, mostrando uma ação bactericida da terapia fotodinâmica sobre o *A. actinomycetemcomitans*.

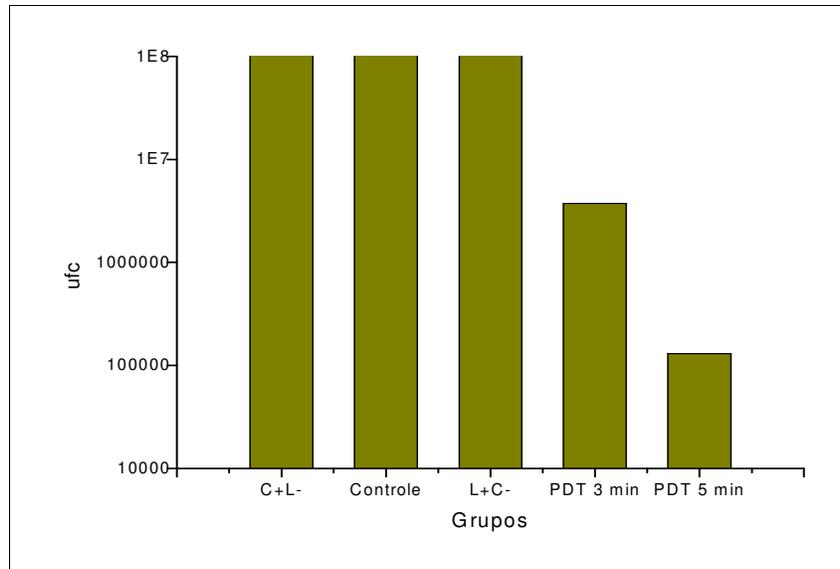


Fig.8 - Número de células viáveis de *A. actinomycetemcomitans* para os grupos investigados.

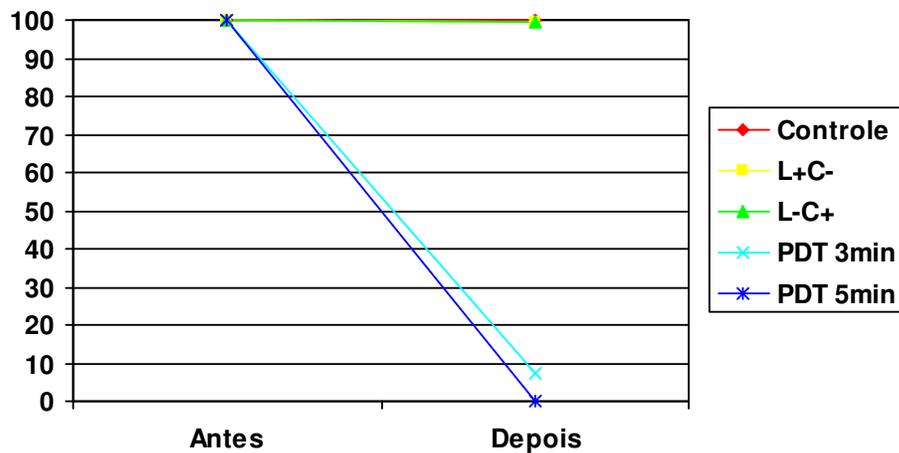


Fig.9 – Redução bacteriana atingida no experimento.

A espectroscopia de absorção do verde malaquita em solução aquosa mostra uma banda de absorção entre 400 nm e 450 nm e outra mais intensa entre 500 nm e 700 nm, conforme mostrado na fig. 10. O equipamento *laser*

utilizado no experimento emite em $\lambda=660$ nm, tendo este comprimento de onda uma absorção na segunda banda deste corante.

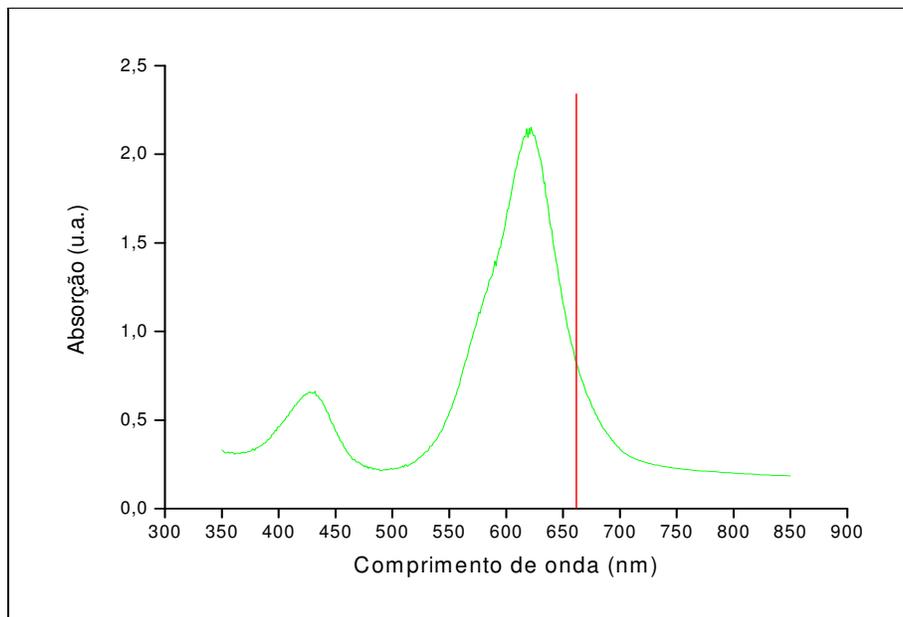


Fig. 10 - Espectro de absorção do verde malaquita no espectro visível e representação do comprimento de onda utilizado no experimento

A PDT com *laser* em $\lambda=660$ nm e verde malaquita 0,01% sobre suspensão de *A. actinomycetemcomitans* mostrou alterações no espectro de absorção quando o varremos no ultravioleta (UV), demonstrando uma queda drástica da absorção após a realização da PDT, como demonstrado na fig. 11.

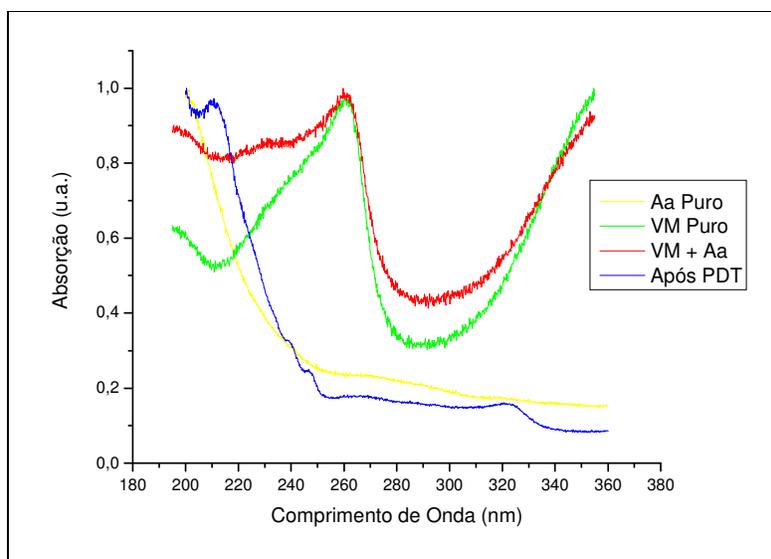


Fig. 11 - Comparação entre os espectros de absorção no ultravioleta da solução de verde malaquita com ou sem *A. actinomycetemcomitans*, antes e após a terapia fotodinâmica por 5 minutos.

Varrendo o espectro na faixa do visível, podemos observar uma diminuição no pico de absorção comparando a amostra sem irradiação às irradiadas nos tempos 3 e 5 minutos, conforme mostram as figs. 12 e 13. Fica evidente que o nível de absorção decai com o tempo, quando analisamos pontualmente o pico de absorção em $\lambda=623$ nm. Fora deste pico de absorção, a amostra sem irradiação mostrou-se menos absorvedora, quando comparado às outras duas após 3 e 5 minutos de irradiação. Esta proximidade nas curvas

de absorção são compatíveis com os resultados em redução bacteriana, que não apresentaram diferenças significantes estatisticamente nos grupos PDT 3 e 5 min.

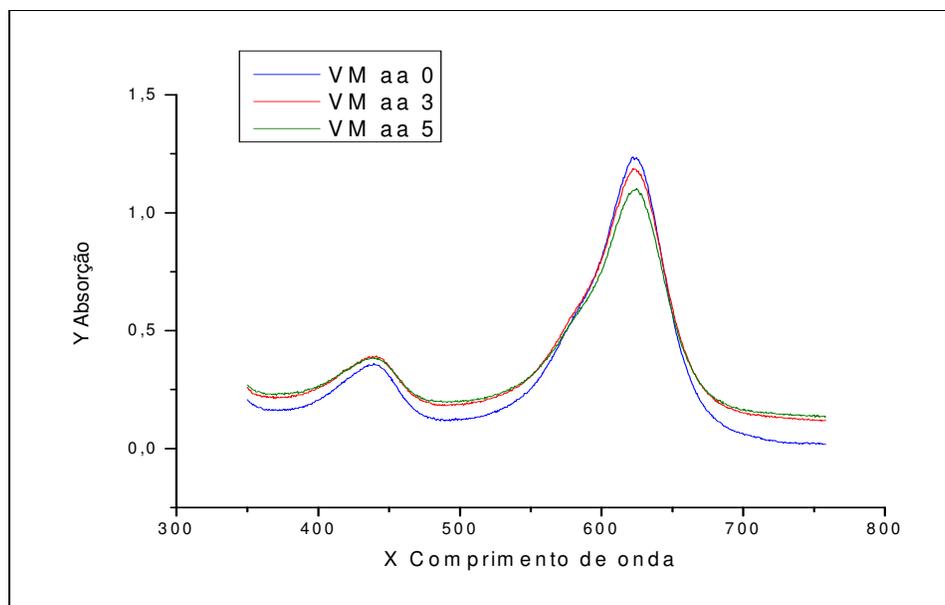


Fig. 12 - Comparação da variação na espectroscopia de absorção óptica dos diversos grupos testados no experimento e das alterações ocorridas na irradiação da suspensão de *A. actinomycetemcomitans* e verde malaquita 0,01%. A curva azul (VM Aa PIT) representa a associação do verde malaquita à suspensão bacteriana após o tempo de pré-irradiação. As outras duas curvas, vermelha e verde representam o grupo PDT por 3 min. (VM A a 3) e PDT por 5 min. (VM A a 5) respectivamente.

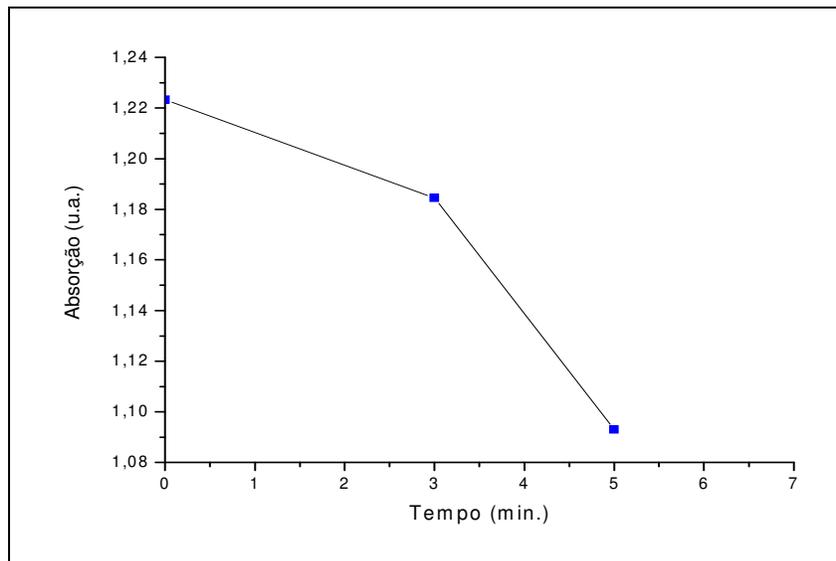


Fig.- 13- Alteração na absorção da suspensão bacteriana com verde malaquita 0,01% em função do tempo, no comprimento de onda correspondente ao pico de absorção em $\lambda=623$ nm.

Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que a exposição da suspensão de *A. actinomycetemcomitans* associado ao corante verde malaquita 0,01% e irradiação *laser* em $\lambda = 660$ nm apresenta um forte potencial bactericida, reduzindo em até 99,9% o número de ufc's. Esse efeito ocorre apesar da aparente ausência de interação lesiva da irradiação *laser* neste comprimento de onda sobre esta espécie bacteriana. Na odontologia, o verde malaquita é bem conhecido e utilizado como evidenciador de biofilme bacteriano para orientação de higiene oral em pacientes portadores da doença periodontal e para quantificação profissional do índice de placa. Ela apresenta uma grande facilidade de trânsito pela membrana celular, tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas.

O verde malaquita na concentração de 0,01% não apresenta toxicidade no escuro para o microorganismo testado, já que ele sozinho, em contato com a suspensão bacteriana, não reduziu o número de células viáveis; existem relatos de sua utilização suplementando meios de cultura seletivos para isolamento de *A. actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de doença periodontal. A cultura é enriquecida com bacitracina e vancomicina, que são antibióticos específicos para bactérias Gram-positivas e o verde malaquita é usado para melhor reconhecimento visual das colônias [32].

A relação entre comprimento de onda emitido pelo *laser* e o espectro de absorção do verde malaquita é essencial para que os efeitos fotoquímicos e fotofísicos ocorram, visto que a luz deve corresponder a um valor dentro da banda de absorção do corante. Uma estreita relação entre absorção do corante

e comprimento de onda deve ser observada na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação citotóxica só ocorre quando a banda de absorção do fotossensibilizador é ressonante com a radiação emitida [10].

Como alguns dos equipamentos *laser* comerciais apresentam comprimentos de onda entre 600 nm e 660 nm, podem-se situá-los dentro da área de ressonância do verde malaquita, apresentando então uma compatibilidade com a terapia fotodinâmica e o corante proposto neste estudo. Entretanto, são muitas as variáveis que influenciam no resultado da terapia fotodinâmica e podemos citar como exemplos a presença de fluidos gengivais, bem como presença de sangue e a própria constituição do biofilme, além da espessura do tecido gengival e presença ou não de melanina nas camadas teciduais. Devido a esta diversidade de variáveis a simples transferência dos achados de redução bacteriana *in vitro* para a clínica pode não apresentar os mesmos resultados [10-12, 14, 27].

O azul de metileno é um conhecido fotossensibilizador catiônico, e sua carga positiva promove uma ligação eletrostática à superfície externa da célula, causando um dano inicial em sua parede, e induzindo uma maior atividade fotodinâmica contra bactérias, [33]. No trabalho de Chan & Lai [10], diferentes comprimentos de onda foram testados juntamente com o azul de metileno na redução *in vitro* do número de *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*. Os autores observaram que os comprimentos de onda utilizados no experimento ($\lambda = 632,8$ nm, $\lambda = 665$ nm e $\lambda = 830$ nm) apresentaram eficiência na redução bacteriana quando associado ao fotossensibilizador, porém, *A.*

actinomycetemcomitans e *F. nucleatum* foram menos sensíveis à terapia quando comparados à *P. gingivalis*, *P.intermedia* e *S. sanguis*.

Nos trabalhos de Wilson e colaboradores, uma grande redução bacteriana foi observada sobre o *F. nucleatum*, *P. gingivallis* e *A. actinomycetemcomitans* utilizando-se o corante azul de toluidina, no entanto, o azul de metileno foi muito pouco efetivo sobre o *A. actinomycetemcomitans*, que apresentou apenas 64% de redução bacteriana quando comparado a 92,6% e 99,9% sobre o *P. gingivallis* e *F. nucliatum*, respectivamente. Estes resultados podem se justificar devido ao comprimento de onda $\lambda = 632,8$ nm, que é muito bem absorvido pelo corante azul de toluidina e pouco ressonante com o azul de metileno, gerando um efeito foto dinâmico menos expressivo. O fato das outras duas espécies bacterianas apresentarem grande redução quando submetidas aos mesmos parâmetros é devido a aparente interação destas espécies à irradiação *laser* neste comprimento de onda [15].

Recentemente, outros autores relataram o uso da PDT sobre o *A. actinomycetemcomitans*, porém seus resultados percentuais neste microorganismo são bem menos expressivos, em torno de 62% [29], diferentemente dos 99,9% alcançados neste estudo. Isto se deve à peculiaridade do verde malaquita, que também apresenta características catiônicas, em se ligar a lipídios passando com facilidade pela membrana da célula e podendo promover efeitos fotoquímicos e fotofísicos tanto na membrana quanto no citoplasma bacteriano [18].

Os resultados encontrados na varredura do espectro de absorção no ultravioleta indicam que, após a terapia fotodinâmica, surgem novas bandas de absorção após a interação *A. actinomycetemcomitans* – verde malaquita, que

sugerem a formação de novos compostos no sistema. Já o espectro de absorção óptica na região visível do espectro eletromagnético (fig. 12) mostra que após a PDT, o pico de absorção diminui em $\lambda = 623,7$ nm (fig. 13), conseqüentemente a área sob a curva diminui em função do tempo de irradiação. Este achado sugere que o verde malaquita se fotodegrada conforme aumenta o tempo de exposição à luz vermelha no sistema *A. actinomycetemcomitans* – verde malaquita. Sabe-se que a fotodegradação do azul de metileno na presença do DNA resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, que contribuem à fotooxidação deste corante [34].

Uma grande vantagem da terapia fotodinâmica é sua ação local e restrita no tratamento, assegurando uma manutenção na ecologia entérica que, normalmente é muito afetada pelos antibióticos, e mesmo a microflora de vários sítios na própria cavidade oral que também não são afetados pelo tratamento local. Apesar de ainda não existirem estudos consistentes sobre resistência bacteriana à ação da terapia fotodinâmica, só o fato dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo nos complexos sistemas bacterianos [5, 10, 12, 19, 27].

Este estudo mostrou que um importante periodontopatógeno pode ser sensibilizado e morto pela apropriada associação entre verde malaquita e irradiação *laser* em $\lambda = 660$ nm. Serão necessários mais trabalhos objetivando a otimização das doses aplicadas com o corante proposto, pois talvez reduzindo a dose, encontraremos resultados similares. Também deve ser observado o comportamento do feixe *laser* no interior do tecido gengival dos pacientes afetados pela doença periodontal. Estudos *in vivo* e ensaios clínicos ainda são necessários para elucidar e solucionar situações impossíveis de

serem analisadas em estudos laboratoriais, além de buscar o entendimento dos mecanismos de ação e causa específica da morte bacteriana.

Conclusão

- O corante verde malaquita associado ao comprimento de onda de 660 nm apresenta um grande potencial para utilização em terapia fotodinâmica;
- O *Actinobacillus actinomycescomitans* pode ser corado e letalmente sensibilizado pela terapia fotodinâmica nos parâmetros utilizados neste experimento.
- Existem alterações espectroscópicas no visível e no ultravioleta, quando observamos o sistema irradiado e comparamos as bandas de absorção antes e após a PDT.

Referências Bibliográficas

1. Wolff, L, Dahlen, G, and Aepli, D, Bacteria as Risk Markers for Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 1994. **65**(5): p. 498-510.
2. Beck, J, Garcia, R, Heiss, G, Vokonas, Ps, and Offenbacher, S, Periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, 1996. **67**(10): p. 1123-1137.
3. Grossi, Sg and Genco, Rj, Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*, 1998. **3**(1): p. 51-61.
4. Socransky, Ss and Haffajee, Ad, Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 2002. **28**: p. 12-55.
5. Nishihara, T and Koseki, T, Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000*, 2004. **36**: p. 14-26.
6. Singmund Socransky, Adh, *Microbiologia da Doença Periodontal*, in *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia oral*, G. Koogan, Editor. 1997: Munksgaard, Copenhagen. p. 92-126.
7. Walker, Cb, Karpinia, K, and Baehni, P, Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol 2000*, 2004. **36**: p. 146-65.
8. Umeda, M, Takeuchi, Y, Noguchi, K, Huang, Y, Koshy, G, and Ishikawa, I, Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000*, 2004. **36**: p. 98-120.
9. Slots, J and Jorgensen, Mg, Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol 2000*, 2002. **28**: p. 298-312.
10. Chan, Y and Lai, Ch, Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 2003. **18**(1): p. 51-5.
11. Komerik, N, Nakanishi, H, MacRobert, Aj, Henderson, B, Speight, P, and Wilson, M, In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(3): p. 932-40.
12. Millson, Ce, Wilson, M, MacRobert, Aj, and Bown, Sg, Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 1996. **32**(1-2): p. 59-65.

13. Felber, Td, Smith, Eb, Knox, Jm, Wallis, C, and Melnick, JI, Photodynamic Inactivation of Herpes-Simplex - Report of a Clinical Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 1973. **223**(3): p. 289-292.
14. Wilson, M, Burns, T, Pratten, J, and Pearson, Gj, Bacteria in Supragingival Plaque Samples Can Be Killed by Low-Power Laser-Light in the Presence of a Photosensitizer. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995. **78**(5): p. 569-574.
15. Wilson, M, Dobson, J, and Sarkar, S, Sensitization of Periodontopathogenic Bacteria to Killing by Light from a Low-Power Laser. *Oral Microbiology and Immunology*, 1993. **8**(3): p. 182-187.
16. Sture Nyman, JI, *Exame em Pacientes com Doença Periodontal*, in *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia oral*, G. Koogan, Editor. 1997: Copenhagen. p. 271-280.
17. Golding, Ps, King, Ta, Maddocks, L, Drucker, Db, and Blinkhorn, As, Photosensitization of Staphylococcus aureus with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1998. **47**(2-3): p. 202-210.
18. Morgon, N, *Espectroscopia Eletrônica e Química Quântica: Partícula na Caixa*. 2004.
19. Loesche, Wj, Syed, Sa, Morrison, Ec, Kerry, Ga, Higgins, T, and Stoll, J, Metronidazole in Periodontitis .1. Clinical and Bacteriological Results after 15 to 30 Weeks. *Journal of Periodontology*, 1984. **55**(6): p. 325-335.
20. Roberto Lotufo, Cmp, *Recursos para diagnóstico microbiológico em periodontia*, in *Periodontia: ciência e clínica*, A. Médicas, Editor. 2001: São Paulo. p. 31-32.
21. Socransky, Ss and Haffajee, Ad, Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 2005. **38**: p. 135-87.
22. Armitage, Gc, Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 1999. **4**(1): p. 1-6.
23. J B Mello, Gpm, *Laser em odontologia*, ed. Santos. 2000, São Paulo. . 81-82.
24. Konan, Yn, Gurny, R, and Allemann, E, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 2002. **66**(2): p. 89-106.

25. Raab, O, On The effect of fluorescent substances on infusoria. *Z Biol*, 1900. **39**: p. 524.
26. Ackroyd, R, Kelty, C, Brown, N, and Reed, M, The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2001. **74**(5): p. 656-69.
27. Wilson, M and Pratten, J, Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med*, 1995. **16**(3): p. 272-6.
28. Matevski, D, Weersink, R, Tenenbaum, Hc, Wilson, B, Ellen, Rp, and Lepine, G, Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res*, 2003. **38**(4): p. 428-35.
29. Pfitzner, A, Sigusch, Bw, Albrecht, V, and Glockmann, E, Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol*, 2004. **75**(10): p. 1343-9.
30. Gasparetto, A, Arana-Chavez, Ve, and Avila-Campos, Mj, Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. *Pesqui Odontol Brás*, 2000. **14**(4): p. 311-318.
31. Gracez, As, Núñez, Sc, Souza, Fr, Cather, Jm, and Ribeiro, Ms, Terapia Fotodinâmica em odontologia. Laser de baixa potência para redução microbina. *Rev. APCD*, 2003. **57**: p. 223-226.
32. Mandell, Rl and Socransky, Ss, A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol*, 1981. **52**(10): p. 593-8.
33. Merchat, M, Spikes, Jd, Bertoloni, G, and Jori, G, Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B*, 1996. **35**(3): p. 149-57.
34. Zhang, Lz and Tang, Gq, The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B*, 2004. **74**(2-3): p. 119-25.