

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2022.



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Gabriel Garcia de Carvalho

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Utilização da Clorina-e6 sobre Biofilme
Periodontopatogênico**

Araraquara

2020



Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Gabriel Garcia de Carvalho

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Utilização da Clorina-e6 sobre Biofilme
Periodontopatogênico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara

2020

Carvalho, Gabriel Garcia de

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da
Clorina-e6 sobre biofilme periodontopatogênico /
Gabriel Garcia de Carvalho.-- Araraquara: [s.n.], 2020
45 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari
Spolidorio

1. Fotoquimioterapia
2. Doenças periodontais
3. Periodontite I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Gabriel Garcia de Carvalho

**Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Utilização da Clorina-e6 sobre Biofilme
Periodontopatogênico**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos (Orientadora)
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -
UNESP

Prof. Dra. Juliana Rico Pires
Centro Universitária da Fundação Educacional de Barretos

Araraquara, 02 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Gabriel Garcia de Carvalho

NASCIMENTO	15 de Abril de 1992 – João Pessoa – PB – Brasil
FILIAÇÃO	Adriana Coeli Garcia de Carvalho Arlan Giovanni Duarte Carvalho
2010 – 2017	Graduação em Odontologia Universidade Federal da Paraíba
2017	Atualização em Cirurgia Oral Associação Brasileira de Odontologia – Secção Paraíba
2018 – Atual	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara

*À Telma Ribeiro Garcia (tia - In memoriam),
pelo suporte incondicional desde meu nascimento
por ser exemplo de ética e profissionalismo
por me guiar e ser meu maior desígnio.*

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, por sonharem comigo este caminho, por todo o apoio e incentivo. Os frutos colhidos serão sempre originados dos princípios que eles forneceram em meu crescimento.

A minhas avós, por constituírem a base de minha família, por iluminar o meu caminho com carinho e cuidado.

À Paula, por todo o companheirismo e paciência, pelos desafios superados ao meu lado, por me estimular nas horas difíceis e brindar minhas conquistas.

À professora, Daniela, a Dani!, por compreender minhas dificuldades e extrair o máximo de minha capacidade. Sou grato pela confiança depositada em mim para conduzir este estudo, pelo seu acolhimento e orientação, e pela preciosa contribuição em minha formação pessoal e profissional.

À professora Denise Spolidorio, por me recepcionar com empatia em seu laboratório e me fazer sentir parte de seu honrado grupo de pesquisa. Sua contribuição é amplamente reconhecida nesta pesquisa.

Aos professores Kleber Oliveira e Alessandra Rasteli, pela orientação na área (fotônica) até então pouco conhecida por mim, e pela disponibilidade de material e equipamento para realização deste estudo.

À Patrícia Maquera, a Patty, pela paciência e disposição em transmitir seu conhecimento e acompanhar os ensaios laboratoriais com rigor.

Ao amigo Julio Puetate, pela sua imensa contribuição e parceria para o desenvolvimento deste estudo, mas ainda, por sua amizade e companheirismo, em especial, nos momentos mais difíceis.

Aos companheiros de mestrado, pela parceria e colaboração durante todo o período do curso.

A todos os funcionários da FOAr, que trabalham diariamente para tornar minúscula as nossas imensas dificuldades.

À FOAr – UNESP, pelo apoio institucional.

À CAPES

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 (Processo: 88882.329991/2019-01).

À FAPESP

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo Nº 2016/00275-8, 2018/0836-2, 2018/00106-7 e 2013/07276-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Meu Nordeste

Nasci na terra seca, dura e sofrida
Onde não se chora a dor deixada pela ferida
Vi o sol queimar o verde e a flor
Deixando o cinza, como principal cor

Pedi a Deus todos os dias
Pra água cair do céu e me dar alegria
Sofri com a fome e a dor
Mas sigo, singelo, com fé e amor

A cicatriz na pele é fruto do trabalho
De onde tirei o sustento
Dia e noite, sem nenhum atropalho

Minha terra amada, de beleza pura e clara
Cheia de glória e lamento
Lugar do meu nascimento
Minha joia rara*

* Diogo Carneiro, Meu Nordeste. Riacho dos Cavalos – PB, Dia do Nordestino, 08 de outubro de 2019.

Carvalho GG. Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 sobre biofilme periodontopatogênico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A resistência bacteriana é uma ameaça real alertada pela OMS. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) pode ser uma das soluções para superar este desafio, uma vez que já demonstra ação antimicrobiana frente a inúmeros patógenos. A clorina-e6 (Ce6) provou ser um fotossensibilizador (FS) com potente efeito quando irradiada pela luz vermelha, contra diferentes biofilmes. No entanto, o principal pico de absorção deste FS está no espectro visível de luz azul, ainda insuficientemente investigado. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da TFDA com utilização da Ce6 irradiada a 450 e 660 nm contra biofilmes relacionados à doença periodontal. Biofilmes monoespécie de *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram desenvolvidos em condições adequadas por cinco dias. A TFDA foi realizada em diferentes concentrações de fotossensibilizador (100 e 200 µM) e comprimentos de onda de luz (450 e 660 nm), e comparada ao controle negativo (DMSO a 1%) e positivo (clorexidina a 0,2%) por análise de unidades formadoras de colônias (UFC) e microscopia confocal. O uso de luz e FS também foram testados individualmente. A maior redução bacteriana foi observada no grupo em que a TFDA foi realizada com utilização da Ce6 a 200 µM e aplicação de luz azul para todas as cepas (redução de 4,01 log₁₀ para *A. actinomycetemcomitans* e redução total para *P. gingivalis* e *S. oralis*), exceto para *F. nucleatum*, onde o melhor resultado foi obtido com a TFDA utilizando irradiação por luz vermelha (redução de 3,36 log₁₀) (p <0,05). O efeito antimicrobiano da TFDA usando Ce6 contra os biofilmes monoespécie testado foi confirmado por meio de microscopia confocal. FS na ausência de luz reduziu significativamente o número de células viáveis quando comparado ao grupo não tratado, em todos os biofilmes testados, exceto para *F. nucleatum*. A correlação entre redução bacteriana e concentração do FS foi observada apenas em biofilmes de algumas cepas testadas. O uso de TFDA mediado por Ce6 promoveu redução significativa de células bacterianas viáveis, com redução mais evidente nos grupos tratados com luz azul para *S. oralis*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Fármacos fotossensibilizadores. Periodontite.

Carvalho GG. Chlorin-e6-mediated antimicrobial photodynamic therapy against periodontitis-related pathogens [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been used in the treatment of many infection diseases as main or adjuvant therapy. Chlorin-e6 (Ce6), as a photosensitizer (PS), has demonstrated significant reduction of microorganisms' viability when irradiated by red light. However, the main absorption peak of this PS is located at blue light visible spectrum, which has been poorly investigated. This study aimed at evaluating the effect of pure-chlorin-e6-mediated aPDT and different light sources (450 or 660 nm) against biofilms related to periodontitis. *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* single-species biofilms were developed under proper conditions for five days. aPDT was performed using different concentrations of Ce6 (100 and 200 μ M), wavelengths (450 and 660 nm) and compared to negative and positive (0.2% Chlorhexidine) control after colony forming unit and confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis. The use of light and PS were also individually tested. The greatest bacterial elimination was observed in the group where aPDT was employed with blue light and concentration of 200 μ M for all bacterial strains tested (reduction of 4.01 log₁₀ for *A. actinomycetemcomitans*, and total elimination for *P. gingivalis* and *S. oralis*), except for *F. nucleatum*, where the lowest mean value was observed in the group that received aPDT with red light and 200 μ M Ce6 (3.36 log₁₀ reduction) ($p < 0.05$). The antimicrobial effects of aPDT mediated by Ce6 for all single pathogenic biofilms were confirmed by live/dead staining under CLSM analysis. For all single-species biofilms, the use of aPDT mediated by chlorin-e6 photosensitizer under blue or red-light irradiation (450 and 660 nm) promoted a significant reduction in bacterial viability, especially in the groups treated with blue light for *S. oralis*, *P. gingivalis*, and *A. actinomycetemcomitans*.

Keywords: Photodynamic Therapy. Photochemotherapy. Photosensitizing Agents. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 PUBLICAÇÃO	16
4 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE - METODOLOGIA	40
ANEXO - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	45

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal afeta grande parte da população mundial, encontrando-se no grupo das patologias bucais mais recorrentes, sendo uma das principais causas da perda dentária. Essa doença tem sua origem relacionada a fatores microbiológicos, e de maneira geral são divididas em gengivite e periodontite, dependendo do tecido comprometido pela inflamação. Trata-se de uma doença infecciosa dependente da interação de bactérias com seu hospedeiro, estas apresentam fatores de virulência que modificam a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, especialmente quando organizadas em forma de biofilme e localizadas no sulco gengival^{1,2}.

A remoção e alteração da microbiota patogênica do biofilme é imprescindível para a prevenção e controle da doença periodontal, sendo a Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) a terapia não-cirúrgica de escolha para tratamento da doença e manutenção da homeostasia periodontal. Apesar dos resultados clínicos positivos obtidos com RAR³⁻⁶, esta terapia pode apresentar limitações e insucessos quando abordada isoladamente em determinados quadros clínicos. Assim, terapias alternativas têm sido investigadas em virtude do limitado acesso à superfície radicular durante RAR⁷⁻⁹, da presença de periodontopatógenos nas bolsas mais profundas¹⁰ e da habilidade de algumas bactérias em invadir tecido adjacente¹¹. Quando consideramos o tratamento de doença periodontal instalada, o uso de antibióticos locais ou sistêmicos é apresentado como alternativa, mas seu uso como coadjuvante pode induzir efeitos sistêmicos indesejáveis e formação de espécies bacterianas resistentes à terapia medicamentosa¹²⁻¹⁴. Além disso, a eficácia da terapia com uso de antibióticos sistêmicos depende da colaboração do paciente em seguir corretamente o protocolo medicamentoso indicado.

Compreendendo o crescimento da resistência das cepas bacterianas pelo uso indiscriminado de antibióticos e o interesse de pesquisadores em buscar estratégias terapêuticas que apresentem pouco ou nenhum efeito colateral, nota-se o crescimento exponencial da utilização dos lasers e de outras fontes de luz no tratamento de diversas patologias, bem como as periodontais^{15,16}. Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) tem se destacado como um procedimento adjunto no combate de infecções microbianas. Diversos estudos comprovam a eficácia da TFDA, tanto in vitro como in vivo, em animais e humanos, no tratamento das doenças periodontais¹⁷⁻²⁸.

A TFDA consiste na excitação do fotossensibilizador (FS, em seu estado fundamental) por uma luz no espectro visível (laser de diodo semicondutores de baixa potência), com a energia absorvida, esta molécula pode sofrer transição ao estado singlete ou tripleto excitado, que poderá

desencadear três reações. Na reação de tipo I, ocorre a transferência de elétron entre o FS e oxigênio molecular, permitindo o seu retorno ao estado fundamental e a formação de espécies reativas de oxigênio. Na reação tipo II, o FS transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental, resultando na produção do oxigênio singlete, um poderoso agente oxidante altamente tóxico para as células²⁹. Acredita-se que os processos do Tipo II preservem melhor a estrutura molecular do FS em um estado fotoativável e, em algumas circunstâncias, uma única molécula de FS pode gerar 10 000 moléculas de oxigênio singlete. Uma terceira via (Tipo III), pouco comum, ocorre na ausência de oxigênio, quando a molécula do FS interage diretamente com uma biomolécula, provocando um dano celular (efeito citotóxico) e consequente destruição do FS²⁹⁻³¹. A TFDA não induz a inviabilidade celular de áreas distantes à área tratada, pois seus produtos citotóxicos (ex. oxigênio singlete e hidroxilas) não migram mais que 0,02 mm após sua formação³².

Dentre as vantagens do emprego desta nova terapia, encontram-se: a diminuição da potência e intensidade da fonte de luz utilizada, viabilizando financeiramente o seu uso e reduzindo o risco de danos aos tecidos e microbiota adjacentes; a morte bacteriana rápida e localizada, evitando a manutenção de altas concentrações de fármacos por longo período (antibióticos e antissépticos); o fato do efeito bactericida não estar ligado à mediação de radicais químicos, reduzindo o risco à resistência bacteriana; o acesso facilitado a regiões de difícil acesso pela terapia convencional (RAR), como bolsas profundas e bi- ou trifurcação de raízes³³.

A TFDA tem sido indicada como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite, retratamento de bolsas residuais, descontaminação para terapia cirúrgica, terapia de manutenção, dentre outros³⁴⁻³⁶. Sua indicação na terapia de manutenção tem como vantagem o menor desgaste da superfície radicular, que seria um aspecto negativo da utilização da técnica convencional (RAR). Neste caso a PDT seria utilizada isoladamente, reduzindo a incidência de hipersensibilidade causada pela remoção de cimento nas múltiplas sessões de RAR³⁷.

Um fotossensibilizador ideal deve ser atóxico, demonstrar toxicidade local apenas após excitação por luz e ter alto rendimento quântico para produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)^{12,38}. Diversos fotossensibilizadores estão descritos na literatura, sendo as fenotiazinas azul de metileno e azul de toluidina os mais referidos^{21,39-44}, porém alguns estudos não têm demonstrado benefícios clínicos adicionais no tratamento periodontal^{21,40,45,46}. Desta forma, novos fotossensibilizadores estão surgindo na estratégia de superar as deficiências destes citados

anteriormente.

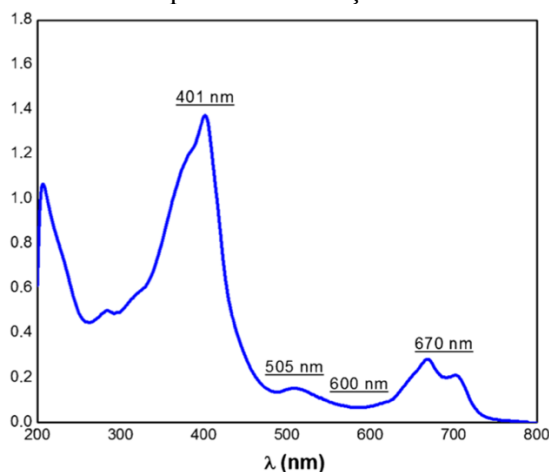
A clorina-e6 (Ce6) surgiu em meados dos anos 90 como um FS de segunda geração bastante promissor inicialmente em terapias oncológicas⁴⁷. A Ce6 e seus derivados estão sendo utilizados em diversos tratamentos com utilização de luz, como cânceres^{48,49}, leucoplasias⁵⁰, infecções endodônticas⁵¹, e contra cepas de *Streptococcus mutans*⁵². Algumas formulações a base de clorina-e6 estão disponíveis no mercado para tratamento antibacteriano, antienvelhecimento e antineoplásico, como Revixan[®], Photolon[®] e Photodithazine[®]. Este FS também demonstrou atividade antimicrobiana, in vitro, quando utilizado sobre bactérias presentes na doença periodontal na forma planctônica, apresentando redução das unidades formadoras de colônia⁵³⁻⁵⁵. Os estudos citados não testaram a utilização desse FS contra microrganismos organizados na forma de biofilme. Os biofilmes são estruturas biológicas constituídas por microrganismos envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, que assegura a sobrevivência dos mesmos^{56,57}, agindo como uma barreira protetora a agentes físicos e químicos externos, o que pode limitar a penetração de agentes antimicrobianos⁵⁸. Particularmente na cavidade oral, o biofilme é responsável pelo desenvolvimento de diversas patologias, incluindo a doença periodontal. Também não foram encontrados na literatura estudos clínicos avaliando a eficácia do uso deste FS diretamente no tratamento da doença periodontal.

Fotossensibilizadores a base de clorina-e6 apresentam dois picos de absorção de luz, na luz vermelha e azul (Gráfico 1). Tradicionalmente, a luz vermelha é preferida por se acreditar em sua maior capacidade de penetração nos tecidos. Porém, comprimentos de onda em torno de 412 nm (azul) apresentaram 30-33% maior coeficiente de absorção de energia e efeito bactericida que comprimentos de onda equivalentes a luz visível vermelha⁵⁹. Estes resultados demonstram que fotossensibilizadores excitados em comprimentos de onda na luz visível azul podem ser preferidos em terapias que visem tratar superfícies, como é o caso dos protocolos antimicrobianos sobre biofilmes.⁶⁰ Um estudo recente avaliou a ativação deste FS nos dois comprimentos de onda, 405 nm (luz azul) e 660 nm (luz vermelha). Para a pele, os valores de saturação foram de aproximadamente 0,2 J/mm² para ambos os comprimentos de onda, indicando que cerca de 40% do incidente da energia é absorvida dentro do tecido. No entanto, para a mucosa, o valor de saturação para comprimento de onda de 405 nm foi de 0,28 J/mm² (56% da intensidade do incidente é absorvida); e para o de 660 nm, a energia absorvida foi muito menor, aproximando-se de 0,03 J/mm² (6% da intensidade do incidente) para a espessura da camada de 4 mm. Por este motivo a

luz azul tem atraído a atenção de pesquisadores e indústrias que sugerem a utilização da luz azul em tratamentos dermatológicos. Em um estudo de otimização de solventes utilizados na diluição de fotossensibilizadores, foi possível observar maior espectro de absorção quando a Ce6 foi diluída em solventes polares e excitada sobre comprimentos de onda de luz azul⁶¹.

É importante levantar que a luz azul está comumente presente na prática odontológica, onde é utilizada na polimerização de materiais restauradores ou fotoativação de adesivos e clareadores, portanto, estes equipamentos já disponíveis no consultório podem ser empregados na terapia fotodinâmica quando fotossensibilizadores ativados na luz azul são escolhidos, reduzindo eventuais custos relativos à equipamentos necessários para realização da TFDA.

Gráfico 1- Espectro de absorção da clorina-e6



Fonte: Elaboração própria.

De maneira geral, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da TFDA com utilização da Ce6 como fotossensibilizador contra patógenos orais^{53-58,62}. Um estudo desenvolvido recentemente avaliou a efetividade de um fotossensibilizador a base de clorina-e6 (Photodithazine[®]) contra biofilme monoespécie de microrganismos periodontopatogênicos, onde a TFDA com uso da clorina-e6 apresentou redução significativa da viabilidade microbiana (1,12 e 2,66 $\log_{10}$)⁶³. O Photodithazine[®] é um fotossensibilizador composto por Ce6 (~60%) e outros derivados do extrato bruto da clorofila. No presente estudo, foi testado o extrato puro da Ce6 (100%), composto ainda não patentado, desenvolvido pelo Laboratório de Química Bio-orgânica, UFSCar – São Carlos. Não há registro de estudos que tenham avaliado a excitação de fotossensibilizadores a base de Ce6 em comprimentos de onda na luz azul contra microrganismos.

Além disto, até o presente momento, não existem relatos na literatura do emprego da TFDA com uso da clorina-e6 como terapia adjunta no tratamento da doença periodontal. Assim, desenvolvemos o presente estudo com a seguinte hipótese principal: a terapia fotodinâmica com utilização da Ce6 apresenta efeito antimicrobiano sobre biofilme de periodontopatógenos.

4 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 apresentou efeito antimicrobiano significativo quando irradiada por luz azul ou vermelha sobre biofilme periodontopatogênico, com redução mais evidente nos grupos tratados com luz azul para *S. oralis*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

REFERÊNCIAS *

1. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, periodontia clínica. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 117-20.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135-87.
3. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis, *J Clin Periodontol*. 1981; 8(1): 57-72.
4. Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, et al. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I. Clinical results, *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 1070-76.
5. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997; 24(5): 324-34.
6. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 Suppl. 2: 6-16.
7. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1988; 59(4): 222-30.
8. A. Aoki, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology* 2000. 2004; 36: 59-97.
9. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology* 2000. 2009; 51: 109-40.
10. Muniz FW, de Oliveira CC, de Sousa Carvalho R, Moreira MM, de Moraes ME, et al. Azithromycin: a new concept in adjuvant treatment of periodontitis, *Eur J Pharmacol*. 2013; 705(1-3): 135-9.
11. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci*. 2007; 12: 3965-74.
12. Theodoro LH, Garcia VG, Ervolino E. Efeitos da terapia fotodinâmica na periodontia. In: Romito et al. Estratégias terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e peri-implantar. Nova Odessa: Napoleão, 2017. 375-87.
13. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol*. 1990; 17(7): 479-93.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Winkelhoff AJ, Herrera GD, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(2): 79-86.
15. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol* 2000. 2009; 51: 109-40.
16. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD. Recent patents on light based therapy: photodynamic therapy, photothermal therapy and photodynamic immunotherapy. *Recent Pat Endocr, Metab Immune Drug Discov.* 2014; 8(1): 1-8.
17. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1100-5.
18. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(3): 219-28.
19. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, et al. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol.* 2010; 81(7): 975-81.
20. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(12): 1106-14.
21. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(4): 687-93.
22. Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(4): 296-302.
23. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 143-50.
24. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.* 2013; 84(4): 556-65.
25. Garcia VG, Longo M, Gualberto Junior EC, Bosco AF, Nagata MJH, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2014; 49(5): 584-94.
26. Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(6): 1647-56.

27. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, et al. Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a clinical and microbiologic short term study. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(2): ZC08-ZC12.
28. Salgado DMRA, Noro-Filho GA, Cortes ARG, Arita ES, Casarin RCV, et al. Effect of photodynamic therapy with malachite green on non-surgical periodontal treatment in HIVpatients: a pilot split-mouth study. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(5): 1213-17.
29. Martinez de Pinillos Bayona A, Mroz P, Thunshelle C, Hamblin MR. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 89(2): 192-206.
30. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, et al. Photodynamic therapy of câncer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4): 250-81.
31. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2005; 2(3): 175 -91.
32. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cellsthat can be used to estimate the lifetime of single oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991; 53(4): 549-53.
33. Fontana CR. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies. 2007. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
34. Lulic M, Leiggenger Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, et al. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized- controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(8): 661-66.
35. Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, et al. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J. Periodontol.* 2014; 85(8): 277-86.
36. Müller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lases Med Sci.* 2015; 30(1): 27-34.
37. Theodoro LH, Garcia VG. Uso do laser e suas implicações como alternativa terapêutica na Periodontia e Implantodontia. IN: Silva EB, Grisi DC. Periodontia no contexto interdisciplinas integrando as melhores práticas. Nova Odessa. Napoleão. 2015; 252-81.
38. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sc Biol Med.* 2015; 6 (Suppl 1): S102-9.
39. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 877-84.

40. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(7): 575–80.
41. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, et al. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(5): 681-88.
42. Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LM, Adabo MD, Lopes T, et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(1): 87-91.
43. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014; 41(6): 573-58.
44. Alwaeli HA, Al-khateeb SN, Al-sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. 2015; 30(2): 801-7.
45. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, et al. Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2016; 14: 93-7.
46. Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, et al. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2014; 85(9): 1222-9.
47. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009; 6(2): 94-6.
48. Wang L-X, Li J-W, Huang J-Y, Li J-H, Zhang L-J, et al. Antitumor activity of photodynamic therapy with a chlorin derivative in vitro and in vivo. *Tumour Biol*. 2015; 36(9): 6839-47.
49. Nishie H, Kataoka H, Yano S, Yamaguchi 4, Nomoto A, et al. Excellent antitumor effects for gastrointestinal cancers using photodynamic therapy with a novel glucose conjugated chlorin e6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 496(4): 1204-9.
50. Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa M, Pietruski JK, et al. Clinical evaluation of photodynamic therapy efficacy in the treatment of oral leukoplakia. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11(1): 34-40.
51. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(1): 59-66.
52. Terra Garcia M, Correia Pereira AH, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic Therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 24: 256-61.
53. Drulis-Kawa Z, Bednarkiewicz A, Bugla-Płoskonska G, Strek W, Doroszkiewicz W. The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inactivation with Fotolon (chlorin e6). *Pol J Microbiol*. 2005; 54(4): 305-10.

54. Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(12): 3364-7.
55. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10): 2595-601.
56. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242(2): 345-51.
57. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(7): 979-86.
58. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Growth rate and the resistance of Gram-negative biofilms to cetrимide. *J Antimicrob Chemother.* 1990; 26(4): 473-8.
59. Huang L, Wand M, Huand YY, El-Hussei A, Wolf LM, et al. Progressive cationic functionalization of chlorin derivatives for antimicrobial photodynamic inactivation and related vancomycin conjugates. *Photochem Photobiol Sci.* 2018; 17(5): 638-51.
60. Shakhova M, Loginova D, Meller A, Sapunov D, Orlinskaya N, et al. Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study. *J Biomed Opt.* 2018; 23(9): 1-9.
61. Paul S, Heng PWS, Chan LW. Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy. *J Fluoresc.* 2013; 23(2): 283-91.
62. [Alves F](#), [Carmello JC](#), [Mima EGO](#), [Costa CAS](#), [Bagnato VS](#), et al. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. [Med Mycol.](#) 2018.
63. [Tavares LJ](#), [de Avila ED](#), [Klein MI](#), [Panariello BHD](#), [Spolidório DMP](#), et al. Antimicrobial photodynamic therapy alone or in combination with antibiotic local administration against biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. [J Photochem Photobiol B.](#) 2018; 188: 135-45.
64. Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, Francisconi RS, Bordini EAF, Marcantonio E et al. . In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. *Biofouling.* 2018; 34(6): 699-709.