



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafaela Martins Perroni

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina-e6 em
diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme simples de
bactéria Periodontopatogênica**

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafaela Martins Perroni

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina-e6 em
diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme simples de
bactéria Periodontopatogênica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-
Barcelos**

Araraquara

2023

P459t	Perroni, Rafaela Martins Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina-e6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme simples de bactéria Periodontopatogênica / Rafaela Martins Perroni. -- Araraquara, 2023 45 f. : il., tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Daniela Leal Zandim-Barcelos 1. Fotoquimioterapia. 2. Doenças periodontais. 3. Periodonto. 4. Microbiologia. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

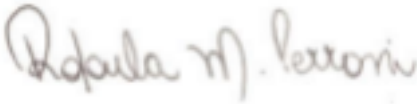
**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Rafaela Martins Perroni

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina-e6 em
diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme simples de
bactéria Periodontopatogênica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Assinatura Orientadora: 

Assinatura Aluna: 

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcio e Carmem, que nunca mediram esforços para fazer com que eu tivesse a oportunidade de estar me formando em uma das melhores Universidades do Brasil. Eles que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, me deram forças e enxergaram o meu melhor nos momentos mais difíceis. Abdicaram dos seus desejos para que o meu sonho se tornasse nosso, para que hoje eu pudesse colher os frutos dessa caminhada.

Dedico também a minha irmã Gabriela, que hoje também formada pela FOAr, sempre foi motivo de inspiração e admiração. Ela que me guiou durante a Graduação, e compartilhou não apenas conhecimento, mas a sua vida comigo. Agradeço pelo privilégio de ter tido a sorte de viver dois anos durante a faculdade com a minha grande companheira.

Dedico aos meus avós que sempre se orgulharam da minha trajetória e vibraram juntos a cada conquista. Que me inspiraram e me deram forças, carregando comigo um pouco de cada um na minha história. Dedico com muito amor, carinho e imensas saudades, à minha vó Adalgiza, que nesse momento irá vibrar com os anjos do céu a entrega do nosso tão sonhado diploma.

E por fim, dedico aos meus grandes e tão especiais amigos, anjos que tive o privilégio de compartilhar a vida ao longo de todos esses anos. Eles que tanto me ensinaram, ajudaram, me fizeram rir e me deram base nos dias de choro. Que me deram a mão e contribuíram profissional e pessoalmente, para que eu me tornasse quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela saúde e proteção que me foram dadas ao longo do caminho, por me atribuir coragem para enfrentar e mudar o que esteve ao meu alcance, paciência e força para lidar com as adversidades que fugiram do meu controle e, sabedoria para diferenciar as duas situações quando ambas apareceram. Sem Ele nada seria possível.

À minha família, principalmente aos meus pais e minha irmã Gabriela, que sempre estiveram ao meu lado e foram a minha base para que minha formação fosse possível. À eles todo o meu amor, carinho, gratidão e admiração por estarem comigo ao longo da minha caminhada, torcendo e vibrando por mim a cada conquista e novo desafio.

À minha orientadora Daniela Leal Zandim-Barcelos e, todos aqueles que me ajudaram pelo caminho, pelo privilégio de fazer parte da sua equipe. Por todo apoio e paciência que teve desde o início até o fim da minha Graduação. Agradeço pelas trocas e por todos os ensinamentos. Deixo aqui meu carinho e admiração.

Ao meu grande amigo, que se tornou minha família ao longo de todos esses anos, Júlio Vallarelli. Minha dupla, que deixou o caminho mais leve e foi meu suporte em todos os momentos da faculdade, que me ouviu e me deu forças quando eu não tinha mais esperanças, que sempre me incentivou e torceu por mim em cada vitória diante dos inúmeros desafios. Deixo aqui meus infinitos agradecimentos, amor, carinho e admiração pela sorte de poder ter compartilhado a vida com ele.

Aos meus amigos, que foram a minha família longe de casa e foram essenciais para que minha graduação fosse mais leve, mais feliz. Agradeço pela sorte de encontrar pessoas que vou levar para a vida. Por ter na prática o significado de amor. Por ter construído com eles as melhores memórias que eu vou guardar sempre com muito carinho e estarei sempre ansiosa pelas próximas que ainda iremos viver.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/10384-7) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Perroni RM. Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina-e6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme simples de bactéria Periodontopatogênica [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) é considerada a terapia não-cirúrgica de escolha para tratamento da doença periodontal (DP). No entanto, esta terapia pode apresentar limitações e insucessos quando utilizada isoladamente em determinados casos clínicos. Assim, terapias alternativas têm sido investigadas para suprir deficiências da RAR que podem estar relacionadas ao limitado acesso à superfície radicular, a presença persistente de periodontopatógenos nas bolsas mais profundas e a habilidade de algumas bactérias em invadir tecidos adjacentes. Dentre estas terapias, destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Tendo em vista os resultados favoráveis obtidos com uso da Ce6 na terapia fotodinâmica em biofilme monoespécie de *A. actinomycescomitans* em nosso projeto anterior, novos experimentos foram propostos. O objetivo foi avaliar o efeito da aPDT com utilização da clorina-e6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda (ativação por luz azul e luz vermelha) em biofilme monoespécie de *Porphyromonas gingivalis* e em biofilme multiespécie de *A. actinomycescomitans*, *S. oralis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*. Foi realizada a padronização da formação dos biofilmes seguindo parâmetros de densidade óptica e contagem de colônias conforme curva de crescimento dos microrganismos previamente estabelecida. O biofilme simples de *P. gingivalis* e o biofilme multiespécie foram formados em condições de atmosfera e meio de crescimento adequados por 5 dias. Posteriormente, estes biofilmes foram tratados com diferentes protocolos, incluindo controle positivo (clorexidina – CHX 0,2%) e negativo (água destilada + DMSO 1%), grupos tratados apenas com fotossensibilizador (FS), grupos tratados apenas com luz e grupos tratados com aPDT (FS + luz). Foram testadas diferentes concentrações da clorina-e6, dois comprimentos de onda (emitidos em azul e vermelho) e uma intensidade de luz (30 J/cm²). A análise quantitativa foi realizada por contagem de colônias e transformadas em UFC/mL para o biofilme monoespécie de *P. gingivalis* e por meio de RT-qPCR para biofilme multiespécie. A distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'Agostino & Pearson, e testes estatísticos adequados foram utilizados para análise dos dados. O uso da aPDT mediado por clorina-e6 em ambos os comprimentos de onda (azul e vermelho) promoveu eliminação bacteriana total no biofilme simples de *P. gingivalis* e resultou na redução da contagem bacteriana de todas as espécies do biofilme multiespécie, sendo este efeito mais evidente para *S. oralis* e *P. gingivalis*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas concentrações de Ce6 testadas em ambos os biofilmes. Baseado nos resultados obtidos, a aPDT com utilização da clorina-e6 pode ser uma terapia adjuvante promissora no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Doenças periodontais. Periodonto. Microbiologia.

Perroni RM. Antimicrobial Photodynamic Therapy using Chlorine-e6 at Different Concentrations and Wavelengths in a Simple Biofilm of Periodontopathogenic Bacteria [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Scaling and Root Planing (RAR) is considered the non-surgical therapy of choice for periodontal disease treatment (PD). However, this therapy may present restrictions and failures in certain clinical cases. Thus, alternative therapies have been investigated to overcome RAR deficiencies that may be related to limited access to the root surface, the persistent presence of periodontopathogens in deep periodontal pockets and the ability of some bacteria to invade adjacent tissues. Among these therapies, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) stands out. In view of the results obtained with the use of Ce6 in photodynamic therapy in monospecies biofilm of *A. actinomycetemcomitans* in our previous project, new experiments were proposed. The objective was to evaluate the effect of aPDT with the use of chlorin-e6 at different concentrations and wavelengths (activation by blue light and red light) on a single species biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and on a multispecies biofilm of *A. actinomycetemcomitans*, *S. oralis*, *F.nucleatum*, *P.gingivalis*. The standardization of biofilm formation was performed following parameters of optical density and colony count according to the previously established growth curve of microorganisms. The single biofilm of *P. gingivalis* and the multispecies biofilm were formed under conditions of adequate atmosphere and growth medium for 5 days. Subsequently, these biofilms were treated with different protocols, including positive control (chlorhexidine - CHX 0.2%) and negative control (distilled water + DMSO 1%), groups treated only with photosensitizer (PS), groups treated only with light and groups treated with aPDT (FS + light). Different concentrations of chlorin-e6, two wavelengths (emitted in blue and red) and a light intensity (30 J/cm²) were tested. Quantitative analysis was performed by counting colonies and transforming them into CFU/mL for the monospecies biofilm of *P. gingivalis* and by means of RT-qPCR for the multispecies biofilm. Data distribution was evaluated using the D'Agostino & Pearson test, and appropriate statistical tests were used for data analysis. The use of aPDT mediated by chlorin-e6 at both wavelengths (blue and red) promoted total bacterial elimination of the *P. gingivalis* single specie biofilm and resulted in a reduction of the bacterial count for all species of the multispecies biofilm, this effect was more evident for *S. oralis* and *P. gingivalis*. No statistically significant differences were observed between the two tested Ce6 concentrations for both biofilms. Based on the results obtained, aPDT with the use of chlorin-e6 may be a promising adjuvant therapy in the non-surgical treatment of periodontal disease.

Keywords: Photochemotherapy. Periodontal diseases. Periodontium. Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 PROPOSIÇÃO.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.1 Processamento da saliva humana.....	20
4.2 Formação do biofilme monoespécie.....	21
4.3 Formação do biofilme multiespécie.....	21
4.4 Tratamento do biofilme.....	22
4.5 Extração do DNA	23
4.6 Análise por PCR em tempo real.....	23
4.7 Análise estatística.....	23
5 RESULTADO.....	25
5.1 Biofilme multiespécie.....	25
6 DISCUSSÃO.....	30
7 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO A	44
ANEXO B	45

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal ocorre na interação de bactérias com diferentes virulências, que apresentam fatores modificadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, especialmente quando estes microrganismos estão organizados em forma de biofilme maduro e localizados no sulco gengival^{1,2}. A Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) é considerada a terapia padrão ouro para o controle da microbiota patogênica presente em condição de doença instalada, porém, quando abordada isoladamente em determinados quadros clínicos, esta terapia pode demonstrar-se insuficiente para o restabelecimento da homeostasia tecidual. Desta forma, terapias alternativas têm sido sugeridas em virtude do limitado acesso à superfície radicular durante RAR³⁻⁵, da presença de periodontopatógenos residuais em bolsas periodontais tratadas⁶ e da capacidade de algumas bactérias em invadir tecidos adjacentes⁷. Quando consideramos o tratamento da doença periodontal instalada, de caráter crônico ou agressivo, o uso de antibióticos locais ou sistêmicos é apresentado como alternativa. No entanto, seu uso como coadjuvante pode induzir efeitos sistêmicos indesejáveis e formação de espécies bacterianas resistentes à terapia medicamentosa⁸⁻¹⁰, infecções antes triviais podem se tornar intratáveis por antibióticos convencionais.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – Photodynamic Antimicrobial Therapy) tem se destacado como um procedimento capaz de induzir a morte rápida e localizada de microrganismos indesejáveis, evitando a manutenção de altas concentrações de fármacos (antibióticos e antissépticos) por longo período e eliminando o risco à resistência bacteriana¹¹. Diversos estudos comprovam a eficácia da aPDT, tanto in vitro como in vivo, em animais e humanos, no tratamento da doença periodontal¹²⁻²¹. 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 aPDT seria utilizada isoladamente, reduzindo a incidência de hipersensibilidade causada pela remoção de cimento nas múltiplas sessões de RAR²².

A aPDT consiste na excitação da molécula (em seu estado fundamental) do fotossensibilizador (FS) 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 fotossensibilizador e oxigênio molecular, permitindo o seu retorno ao estado fundamental e a formação de espécies reativas de oxigênio. Na reação tipo II, o fotossensibilizador transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental, resultando na produção do oxigênio singleto, um poderoso agente oxidante altamente tóxico para as células²³. Acredita-se que os processos do Tipo II preservem melhor a estrutura molecular do fotossensibilizador em um estado fotoativável e, em algumas circunstâncias, uma única molécula de fotossensibilizador pode gerar 10.000 moléculas de oxigênio singleto. Uma terceira via (Tipo III), pouco comum, ocorre na ausência de oxigênio, quando a molécula do fotossensibilizador interage diretamente com uma biomolécula, provocando um dano celular (efeito citotóxico) e consequente destruição do fotossensibilizador²³⁻²⁵. A aPDT não induz a inviabilidade celular de áreas distantes à área tratada, pois seus produtos citotóxicos (ex. oxigênio singleto e hidroxilas) não migram mais que 0,02 mm após sua formação²⁶.

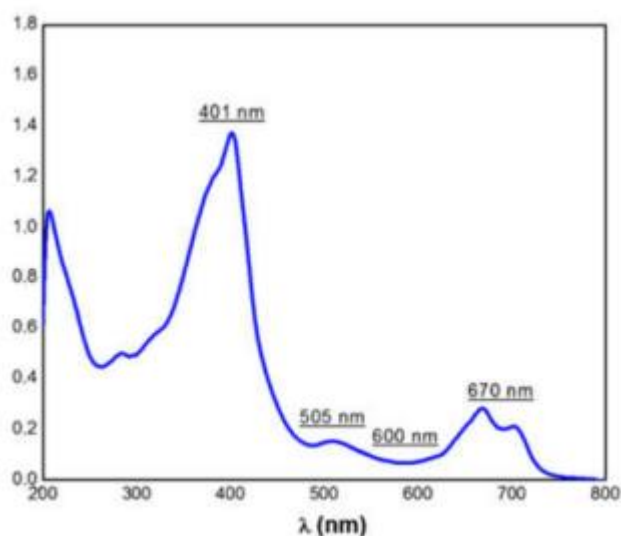
Diversos fotossensibilizadores estão descritos na literatura, sendo as fenotiazinas azul de metileno e azul de toluidina, os mais referidos²⁷⁻³³; porém, alguns estudos não têm demonstrado vantagens clínicas no tratamento periodontal^{28,34-36}. Desta forma, novos fotossensibilizadores estão surgindo na estratégia de superar as deficiências destes citados anteriormente.

Utilizada em terapias oncológicas, a clorina-e6 (Ce6) surgiu em meados dos anos 90 como um fotossensibilizador de segunda geração bastante promissor³⁷. A clorina-e6 e seus derivados estão sendo utilizados em diversos tratamentos com utilização de luz, como cânceres^{38,39}, leucoplasias⁴⁰, infecções endodônticas⁴¹. Este fotossensibilizador também demonstrou atividade antimicrobiana, *in vitro*, quando utilizado sobre bactérias presentes na doença periodontal na forma planctônica, apresentando redução das unidades formadoras de colônia⁴²⁻⁴⁴.

Fotossensibilizadores a base de clorina-e6 apresentam dois picos de absorção de luz, na luz vermelha (~660 nm) e azul (~412 nm)⁴⁵ (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 apresentaram 30-33% maior coeficiente de absorção de energia e efeito bactericida que comprimentos de onda equivalentes a luz visível vermelha⁴⁶, o que pode tornar promissor o seu uso na terapia antimicrobiana. Um estudo recente avaliou a ativação deste fotossensibilizador

em dois comprimentos de onda, 405 nm (luz azul) e 660 nm (luz vermelha)⁴⁷. 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 tecido⁴⁷. 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 mm⁴⁷. Em um estudo de otimização de solventes utilizados na diluição de fotossensibilizadores, foi possível observar maior espectro de absorção quando a clorina-e6 foi diluída em solventes polares e excitada sobre comprimentos de onda de luz azul⁴⁸.

Gráfico 1- Espectro de absorção da clorina-e6



Fonte: Elaboração própria.

De maneira geral, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da aPDT com utilização da clorina-e6 como fotossensibilizador contra microrganismos associados à doença periodontal⁴⁹⁻⁵⁴. Não há registros de estudos que avaliaram o efeito deste FS em microrganismos quando excitado por luz azul. Um estudo publicado recentemente, avaliou o efeito da terapia fotodinâmica com utilização de um fotossensibilizador derivado da clorina-e6 (Photodithazine[®]) ativado com luz vermelha (660 nm) em biofilme de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, demonstrando redução da viabilidade bacteriana em 1,12 log10 e 2,66 log10,

respectivamente⁵⁵. Ambas bactérias são reconhecidas como bactérias importantes na evolução e severidade da doença periodontal, porém este estudo não avaliou o efeito da ativação do fotossensibilizador em comprimentos de onda menores (azul) ou o efeito em outros microrganismos periodontopatogênicos. O Photodithazine® é um fotossensibilizador composto por clorina-e6 (~60%) e outros derivados do extrato bruto da clorofila. No presente estudo será testado o extrato puro da Ce6 (100%), composto ainda não patentado, desenvolvido pelo Laboratório de Química Bio-orgânica, UFSCar – São Carlos. Além disto, até o presente momento, não existem relatos na literatura do emprego da aPDT com uso da clorina-e6 como terapia adjunta no tratamento da doença periodontal. Assim, o presente projeto investigou o efeito da terapia fotodinâmica com utilização da clorina-e6 em biofilme de microrganismo periodontopatogênico.

2 PROPOSIÇÃO

Determinar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda (ativação por luz azul e luz vermelha) em biofilme monoespécie de *Porphyromonas gingivalis* por meio de análise por UFC, e em biofilme multiespécie de *Aggregatibacter. actinomycetemcomitans*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* por meio de RT-qPCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A aPDT é uma modalidade de tratamento composto por um fotossensibilizador e uma fonte de luz (com comprimento de onda adequado). Os fotossensibilizadores (capazes de absorver a energia da luz) quando aplicados no local desejado (no caso em bolsas periodontais) se ligam às células alvo e ocorre uma reação química pela ativação da fonte luz; que libera oxigênio singleto e radicais livres que são citotóxicos para a membrana celular, promovendo uma diminuição em células patogênicas nos tecidos periodontais sendo uma possibilidade de tratamento adicional à raspagem e alisamento radicular⁵⁵⁻⁵⁸.

Nesta revisão de literatura, estudos clínicos randomizados que utilizaram a aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite foram buscados na base de dados PUBMED. Foram selecionados artigos publicados no período de 2010 a 2021 na língua inglesa. Os descritores utilizados na busca foram: “periodontal disease and antimicrobial photodynamic therapy”, “periodontitis and antimicrobial photodynamic therapy”, “periodontal disease and photodynamic antimicrobial chemotherapy”, e “periodontitis and photodynamic antimicrobial chemotherapy”. O quadro 1 apresenta um resumo dos trabalhos selecionados.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Berakdar et al., 2012	RCT 22 pacientes não-fumantes Boca dividida	Periodontite crônica	Teste: RAR manual + aPDT Controle: RAR manual	Laser de diodo 670 nm	Azul de metileno 0,005%	150 mW 60s	Redução significativamente maior da PS no grupo teste. RAR + aPDT parece ser eficaz e, portanto, adequada como terapia adjuvante para o condicionamento mecânico das bolsas periodontais em pacientes com doenças periodontais crônicas.
Noro Filho et al., 2012	RCT 12 pacientes com HIV Boca dividida	Periodontite Crônica associada ao HIV	Teste: RAR ultrassônica + aPDT Controle: RAR ultrassônica	Laser de Diodo 660 nm	Azul de metileno 0,01%	0,03 W 133 s	A terapia fotodinâmica não promoveu benefícios clínicos para tratamento de furca classe II. No entanto, foram demonstradas vantagens nos níveis locais de citocinas e uma redução nos periodontopatógenos.
Theodoro et al., 2012	RCT 33 pacientes não fumantes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual + aPDT Controle: RAR manual	Laser de diodo/GaAlAs 660 nm	Azul de toluidina 100 ug/ml	30 mW 4,5 J 150 s/sítio 0,4 W/cm ² 64,28 J/ cm ²	aPDT como adjuvante ao tratamento periodontal promoveu reduções significativas em alguns dos principais patógenos periodontais, mas não promoveu nenhum benefício clínico significativo.
Dilsiz et al., 2013	RCT 24 pacientes não-fumantes Boca dividida	Periodontite crônica	Teste: RAR ultrassônica boca toda + RAR manual após 1 semana + aPDT Controle: RAR ultrassônica boca toda + RAR manual após 1 semana + laser placebo	Laser diodo/AlGaAs 808 nm	Azul de metileno 1%	100 mW 6J 60 s	Em pacientes com periodontite crônica, os resultados clínicos do tratamento periodontal foram semelhantes para os grupos com e sem uso da aPDT.
Balata et al., 2013	RCT 22 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR ultrassônica boca toda Controle: RAR ultrassônica boca toda + aPDT	Laser de diodo/AsGaAl 660 nm	Azul de metileno 0,005%	100 mW 9 J 90 s/sítio 320 J/cm ²	Ambos os grupos resultaram em melhora clínica significativa, no entanto, a aPDT não resultou em nenhum benefício adicional.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (continuação)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Luchesi et al., 2013	RCT 37 pacientes	Periodontite Crônica	Teste: RAR Controle: RAR + aPDT	Laser de diodo 660 nm	Azul de metileno 0,01%	0,06W 129J/cm ² 60s	A aPDT não promoveu benefícios clínicos para tratamento de furca classe II; no entanto, foram demonstradas vantagens nos níveis locais de citocinas e uma redução nos periodontopatógenos.
Betsy et al., 2014	RCT 88 pacientes não fumantes Paralelo	Periodontite crônica	Teste: RAR boca toda manual e ultrassônica +aPDT Controle: RAR boca toda manual e ultrassônica	Laser de diodo 655 nm	Azul de metileno 10 mg/ml	1000 mW 60s/sítio 60 mW/cm ²	Redução significativa na PS e NCI no grupo de teste em comparação com o controle (p <0,05). A aPDT atua como um coadjuvante benéfico à RAR no tratamento não cirúrgico e no manejo da periodontite crônica em curto prazo.
Chitsaz et al., 2014	RCT 24 pacientes	Periodontite agressiva	Teste: RAR + aPDT Controle: RAR	Laser de diodo 670 a 690 nm	Azul de toluidina 1 mg/ml	75 mW 2 min	Os resultados não mostraram benefícios adicionais da aPDT como um tratamento adjuvante para pacientes com periodontite agressiva.
Moreira et al., 2015	RCT 20 pacientes Boca dividida	Periodontite agressiva	Teste: RAR + aPDT (4 aplicações) Controle: RAR	Laser de diodo 670 nm	Cloreto de fenotiazina 10 mg/ml	75 mW 10 s por sítio de cada dente	A aplicação de quatro sessões de aPDT, adjuvante ao SRP, promove benefícios clínicos, microbiológicos e imunológicos adicionais no tratamento de bolsas periodontais profundas em dentes unirradiculares em pacientes com AgP.
Alwaeli et al., 2015	RCT 21 pacientes	Periodontite Crônica	Teste: RAR+aPDT Controle: RAR;	Laser de diodo 660 nm	Cloreto de fenotiazina	100 mW, 1 min por dente	Os parâmetros clínicos PS, SS e NIC foram avaliados no início e após 3, 6 e 12 meses. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos no início do estudo. PS e SS mostraram redução significativa, e NIC mostrou ganho significativo do baseline para todos os três pontos de tempo em ambos os grupos. Além disso, houve redução PS e ganho de inserção significativamente maiores para RAR + aPDT do que para RAR. Nenhum efeito adverso da aPDT foi observado.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (continuação)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Monzavi et al., 2016	RCT 50 pacientes	Periodontite crônica	Teste: RAR boca toda manual e ultrassônica +aPDT (4 aplicações: 0, 7, 17 e 27 dias). Controle: RAR boca toda manual e ultrassônica	Laser de diodo 810 nm	Indocianina verde 1 mg/ml	200 mW 40 s	aPDT como uma abordagem adjuvante produziu resolução completa da inflamação e redução significativa na PS. No entanto, o aPDT não teve vantagens adicionais no ganho de inserção clínica e índice de placa.
Malgikar et al., 2016	RCT 24 pacientes Boca dividida	Periodontite crônica	Teste: RAR boca toda manual e ultrassônica+ aPDT Controle: RAR boca toda manual e ultrassônica	Laser de diodo 980 nm	Azul de metileno 1%	1000 mW 30–45 s/sítio	Em pacientes com periodontite crônica, a combinação de uma única aplicação de PDT fornece benefício adicional para RAR em termos de parâmetros clínicos 6 meses após a intervenção.
Castro dos Santos et al., 2016	RCT 20 pacientes diabetes mellitus tipo 2 Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR ultrassônica + aPDT Controle: RAR ultrassônica	Laser de Diodo 660 nm	Azul de metileno 0,005%	60 mW 60 s	A aplicação adjuvante de aPDT à RAR ultrassônica não apresentou benefícios clínicos adicionais para o tratamento da periodontite crônica em pacientes diabéticos tipo 2.
Al-Askar et al., 2017	RCT 70 pacientes não fumantes pré-diabéticos Paralelo	Inflamação periodontal	Teste: RAR boca toda ultrassônica+ aPDT Controle: RAR boca toda ultrassônica	Laser de diodo 670 nm	Azul de metileno 0,005%	150 mW 60 s/sítio	Em curto prazo, o desbridamento mecânico é eficaz na redução da inflamação periodontal em pacientes pré-diabéticos. A aPDT associada não mostrou resultados relevantes nesse aspecto.
Segarra-Vidal et al., 2017	RCT 60 pacientes Paralelo	Periodontite Crônica	Teste: RAR + aPDT Controle: RAR	Laser de Diodo 670 nm	Azul de metileno 0,005%	150 mW 60 s	Exceto por uma redução significativa na carga patogênica de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , a PDT coadjuvante não resultou em nenhuma melhora adicional em comparação com RAR sozinha em pacientes com periodontite crônica moderada a avançada.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (continuação)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Bundipun et al., 2018	RCT 20 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR boca toda ultrassônica + aPDT (1 semana depois) Controle: RAR boca toda ultrassônica	Laser de diodo 660 nm	Cloreto de fenotiazina	100 mW 10 s/sítio (6 sítios por dente)	Todos os parâmetros clínicos no grupo de teste foram melhores do que no controle, porém com diferenças significativas apenas para os índices de sangramento e inflamação gengival em 3 e 6 meses após o tratamento.
Raut et al., 2018	RCT 50 pacientes Paralelo	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual e ultrassônica + aPDT Controle: RAR manual e ultrassônica + laser placebo	Laser de diodo/GaAlAs 810 nm	Indocianina verde 5 mg/ml	800 mW 60 s/dente 5,4 J/cm ²	Redução significativa PS, NCI e SS no grupo de teste em comparação com o controle após 6 meses. A cultura anaeróbia de amostras de placa do grupo teste também revelou uma redução significativa de microrganismos em comparação com o controle
Katsikanis, Strakas, Vouros, 2019	RCT 21 pacientes Fumantes (<10cig./dia) Boca dividida	Periodontite crônica	Teste: RAR+aPDT (3 sessões) Controle: RAR	Laser de diodo/ GaAlAs 670 nm	Azul de metileno 1%	350 mW 2 min/dente 0.445 W/cm ²	Após 6 meses de avaliação, a aPDT em conjunto com RAR não mostrou nenhum benefício clínico adicional no tratamento periodontal convencional.
Ivanaga et al., 2019	RCT 25 pacientes diabetes mellitus tipo 2 Boca dividida	Periodontite Crônica	Controle: RAR Testes: RAR + curcumin; RAR + LED; RAR + aPDT (curcumin + LED)	LED 465-485 nm	Curcumina 100 mg/L	78 mW 100 mW 60 s	O tratamento de bolsas residuais em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 através da associação de RAR com aPDT pode trazer benefícios clínicos de curto prazo (três meses) em relação ao ganho de inserção.
Joshi et al., 2019	RCT 29 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual e ultrassônica + aPDT Controle: RAR manual e ultrassônica	Laser de diodo 810 nm	Indocianinaverde (1 mg/ml)	0,2 W 30 s	Uma melhora significativa na PS e NCI foram registrados no grupo teste em relação ao controle após 3 meses do tratamento. Assim, a aPDT mediada por ICG quando usada como adjuvante melhorou a eficácia do RAR.
Hill et al., 2019	RCT 20 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual e ultrassônica + aPDT Controle: RAR manual e ultrassônica	Laser de Diodo 808 nm	Indocianina Verde 0,1mg/ml	100 mW 20s 2 kHz 2829J/cm ²	A única diferença significativa entre o grupo controle e o grupo aPDT foi uma quantidade menor transitória de fluido no sulco no grupo teste durante o primeiro acompanhamento. Com os parâmetros aplicados, este estudo não suporta de forma conclusiva aPDT com utilização de ICG

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (continuação)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Sethi e Rauth, 2019	RCT 30 pacientes	Periodontite Crônica	Teste: RAR + aPDT Controle: RAR	Laser de Diodo 810 nm	Indocianina Verde 5 mg/ml	0,8 W 60 s 5.4 J/cm ²	Redução significativa foi observada em todos os parâmetros clínicos no grupo de teste. A cultura anaeróbia de amostras de placa do grupo teste também revelou redução significativa de microrganismos em comparação com o controle. Indocianina Verde pode atuar como uma alternativa a outros fotossensibilizadores na aPDT como um coadjuvante da RAR no tratamento da periodontite crônica.
AlAhmari et al., 2019	RCT 83 pacientes fumantes e não fumantes	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual+ aPDT Controle: RAR manual	Laser de Diodo 660 nm	Azul de metileno 0.005%	75 mW/cm ² 60 s	Os resultados da RAR com ou sem aPDT para o tratamento de pacientes fumantes estão comprometidos. Entre os que nunca fumaram, os resultados da RAR com ou sem aPDT são comparáveis. O benefício da aPDT permanece questionável no tratamento da periodontite crônica.
Al-Khureif et al., 2019	RCT 17 pacientes	Periodontite Estágio II ou IV Grau C	Teste: RAR ultrassônico+ aPDT (4 aplicações: após RAR, 3, 7 e 14 dias após RAR) Controle: RAR ultrassônico+ antibiótico (metronidazol + amoxicilina)	Laser de Diodo 670 nm	Cloreto de Fenotiazina 10 mg/ml	75 mW 10 s/sítio (6 sítios por dente) 0.25 mW/cm ² 2.49 J/cm ² por sítio 14.94 J/cm ² por dente	A aPDT reduziu significativamente a PS e NCI em 3 e 6 meses após o tratamento, enquanto a combinação de antibióticos ajudou na redução da citocina pró-inflamatória IL-17 e no aumento da IL-10 no GCF dos pacientes.
Sena et al., 2019	RCT 27 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR + aPDT Controle: RAR	Laser 660 nm	Ftalocianina de cloro-alumínio	100 mW 15 s	a aPDT com ftalocianina cloro-alumínio como terapia adjunta a RAR não proporcionou benefícios adicionais na redução da PS e ganho de inserção clínica.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (continuação)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
De Melo Soares et al., 2019	RCT 20 pacientes fumantes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR + aPDT (4 aplicações: 0, 2, 7 e 14 dias após RAR) Controle: RAR	Laser de Diodo 660 nm	Cloreto de fenotiazina 10 mg/ml	70 mW 10 s/sítio 28 mW/cm ² 2.79 J/cm ² por sítio 16.72 J/cm ² por dente	O tratamento periodontal com SRP + aPDT em episódios múltiplos não foi capaz de promover benefícios clínicos, imunológicos e microbiológicos adicionais em fumantes quando comparado o SRP isolado em pacientes com periodontite crônica.
Harmouche et al., 2019	RCT 36 pacientes Boca dividida	Periodontite Crônica	Teste: RAR manual e ultrassônica + aPDT (3 aplicações: 0, 7 e 14 dias após RAR) Controle: RAR manual e ultrassônica	Laser de Diodo 625-635 nm	Azul de toluidina 0,1 mg/ml	2000 mW/cm ² 10-30s dentro bolsa e 10 s transgengival	As aplicações repetidas de aPDT melhoraram significativamente os resultados de RAR, reduzindo em mais de 40% bolsas residuais > 5 mm na PS inicial e SS. O efeito da aPDT foi negativamente influenciado pelo acúmulo de placa dentária.
de Araújo Silva et al., 2020	RCT 22 pacientes	Periodontite	Teste: RAR manual + aPDT Controle: RAR	Laser 660 nm	Ftalocianina de cloro- alumínio 0.5 mL, 5 µM	100 mW 15 s/sítio 0,028 cm ² 54 J/cm ²	Embora aPDT com Cloro-alumínio ftalocianina não tenha apresentado benefícios significativos, o tratamento periodontal empregado resultou na diminuição da SS, PS, NCI após 3 e 6 meses de tratamento. Além disso, a menor necessidade de produção de glutatona pode sugerir inicialmente um benefício adicional da aPDT no restabelecimento precoce do equilíbrio entre os agentes oxidativos e não oxidativos relacionados ao estresse oxidativo.
Niazi et al., 2020	RCT 73 pacientes	Periodontite crônica	Teste: RAR ultrassônica+ aPDT Controle: RAR	Laser de Diodo/ GaAlAs 810 nm	Indocianina Verde	100 mW 60 s (dentro bolsa e 60 s tec. gengival)	aPDT ajudou na redução da inflamação periodontal e resultou em ganho clínico de inserção significativo em comparação ao grupo controle.

Quadro 1 - aPDT como terapia adjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite (conclusão)

Autor e Ano (ref)	Tipo estudo/ Número participantes	Diagnóstico Periodontal	Tratamento realizado	Luz	FS	Parâmetro Luz/ tempo exposição	Achados
Rahman, Gv, Mehta, 2020	RCT 11 pacientes	Periodontite Estágio II Grau A	Testes: RAR manual + aPDT; RAR manual + Gel subgingival de sinvastatina 1,2% Controle: RAR manual	Laser de Diodo 810 nm	Indocianina Verde	500 mW 10 s/sítio (6 sítios por dente)	A aplicação de aPDT e de 1,2% gel de sinvastatina 1,2% como adjuvantes à RAR e apenas a RAR foram eficazes na melhoria dos parâmetros clínicos. Não foi possível determinar superioridade de uma modalidade de tratamento em relação às outras neste estudo em curto prazo
Al-Momani, 2021	RCT 50 pacientes diabetes mellitus tipo 2 Boca dividida	Periodontiteestágio III Grau C	Teste: RAR boca toda manual e ultrassônico+ aPDT Controle: RAR boca toda manual e ultrassônico	Laser de Diodo 810 nm	Indocianina Verde 0,5 mg/ml	200 mW 4J 40 s	A aPDT melhorou significativamente os parâmetros clínicos e antimicrobianos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 bem controlado e mal controlado. O estado glicêmico não teve impacto negativo na redução dos parâmetros periodontais.
Cláudio et al., 2021	RCT 34 pacientes diabetes mellitus tipo 2 descompensada	Periodontite estágio III e IV grau C	Teste: RAR manual e ultrassônica + aPDT (3 aplicações: 0, 48 e 96h após RAR) Controle: RAR manual e ultrassônica	Laser de Diodo/ InGaAlP 660 nm	Azul de metileno 10 mg/ml	100 mW 50 s 157 J / cm ² 4.7 J	O grupo teste apresentou uma redução significativa no número de bolsas residuais aos 90 e 180 dias e apresentou maior média de redução PS em bolsas profundas 180 dias pós-tratamento (p <0,05). Nenhuma diferença foi observada na avaliação microbiológica. O uso de múltiplas sessões de aPDT como terapia adjuvante no tratamento periodontal de pacientes diabéticos descompensados com periodontite promoveu benefícios clínicos adicionais.

Fonte: Elaboração própria.

Embora existam muitos estudos sobre o tema proposto, ainda não há um consenso na literatura em relação ao benefício adicional da aPDT como terapia complementar ao tratamento periodontal convencional. De forma majoritária, de acordo com a nossa revisão, os trabalhos dos autores Berakdar et al.⁵⁹ (2012), Betsy et al.⁵⁸ (2014), Moreira et al.⁶⁰ (2015), Alwaeli et al.³³ (2015), Monzavi et al.³⁵ (2016), Malgikar et al.⁶¹ (2016), Bundidpun et al.⁶² (2018), Raut et al.⁶³ (2018), Ivanaga et al.⁶⁴ (2019), Joshi et al.⁶⁵ (2019), Sethi e Rauth⁶⁶ (2019), Al-Khureif et al.⁶⁷ (2019), Harmouche et al.⁶⁸ (2019), Niazi et al.⁶⁹ (2020), Al-Momani.⁷⁰ (2021), Cláudio et al.⁷¹ (2021), apresentaram melhores resultados quando a aPDT foi realizada após RAR em comparação ao grupo controle. Além disso, os trabalhos realizados por Noro Filho et al.⁵⁸ (2012), Theodoro et al.³⁴ (2012), Luchesi et al.⁷² (2013), Segarra-Vidal et al.⁷³ (2017), Hill et al.⁷⁴ (2019), relataram a ausência de diferenças relevantes nos parâmetros clínicos em questão, ressaltando, porém, efeitos positivos na redução de citocinas inflamatórias, microrganismos patogênicos e volume de fluido crevicular gengival, quando comparados a longo prazo. Por outro lado, de acordo com Dilsiz et al.⁷⁵ (2013), Balata et al.⁷⁶ (2013), Chitsazi et al.⁷⁷ (2014), dos Santos et al.⁷⁸ (2016), Al-Askar et al.⁷⁹ (2017), Katsikanis, Strakas e Vouros.⁸⁰ (2019), AlAhmari et al.⁸¹ (2019), Sena et al.⁸² (2019), de Melo Soares et al.⁸³ (2019), de Araújo Silva et al.⁸⁴ (2020), Rahman e Mehta.⁸⁵ (2020), nenhum efeito adicional da aplicação da aPDT foi constatado. É importante destacar que nenhum efeito negativo ou reação adversa à aPDT foram relatadas nos estudos.

4 MATERIAL E MÉTODO

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram *Streptococcus oralis* (American Type Culture Collection - ATCC® 35037™), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC® 25586™), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC® 33277™) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JP2, gentilmente fornecida pelo Laboratório do Prof. Mario Júlio Ávila-Campos (*in memorian*) da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, Brasil).

Todas as cepas bacterianas foram cultivadas em ágar brucela (Agar Brucella, Neogen, Idaiatuba, SP, Brasil; placa de Petri 90x10cm, Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 5% (Microlab, Campinas, SP, Brasil), extrato de levedura (6 g / L), hemina (10 mg / mL) e menodiona (5 mg / mL), a 37 °C em condições atmosféricas adequadas para formação de biofilme periodontopatogênico com cepas bacterianas anaeróbias, e mantidas em câmara de anaerobiose (VA 500, Don Whitley Scientific, Inglaterra) com mistura de gases 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, (White Martins, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Após 48 h, as colônias bacterianas foram transferidas para 10 mL de meio líquido (BHI - Difco Laboratories Inc, MI, EUA) suplementado com extrato de levedura (6 g/L), hemina (10 mg/mL) e menadiona (5 mg/mL), e incubadas nas condições descritas anteriormente por 24 h. Finalmente, as células bacterianas foram ajustadas por densidade ótica em meio fresco, de acordo com a fase exponencial de crescimento previamente estabelecida (*P. gingivalis*, 15 h, OD_{600 nm} = 0.95 ± 0.01; *F. nucleatum*, 10 h, OD_{600 nm} = 0.45 ± 0.01; *S. oralis*, 4 h, OD_{600 nm} = 0.55 ± 0.01; *A. actinomycetemcomitans*, 8 h, OD_{600 nm} = 0.18 ± 0.01) usando espectrofotômetro (BioSpectrometer® D30, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)⁵⁴.

4.1 Processamento da saliva humana

Antes da coleta da saliva humana, o protocolo de pesquisa foi submetido a avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade do Estado de São Paulo. Após aprovação (CAAE 23396619.5.0000.5416), a saliva foi obtida, sem estímulo, de homens jovens saudáveis, sem cárie ativa ou doença periodontal, sem aparelho ortodôntico, sem doença sistêmica, em jejum e sem escovação dentária nas 12 h que antecedem a

coleta, e sem relato de uso de antibióticos por pelo menos seis meses antes da coleta. A saliva foi processada seguindo protocolo descrito por Tavares et al⁸⁶.

4.2 Formação do biofilme monoespécie

O biofilme monoespécie foi formado com a cepa bacteriana de *P. gingivalis*. A formação de película salivar ocorreu no fundo da superfície de placas de 96 poços convencionais (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil). Cinquenta microlitros de saliva foram adicionados aos poços e a placa foi mantida em agitador orbital (Incubadora 430 RD, Nova Etica, Brasil), 75 rpm a 37 °C por 4 h⁸⁶. Após ajuste do microrganismo em caldo de acordo com curva de crescimento (fase exponencial) por meio de densidade óptica (Eppendorf BioPhotometer® D30, Hamburg, Alemanha) e UFC/mL⁵⁵, 200 µL de cada suspensão bacteriana correspondendo a 1×10^7 UFC/mL foi adicionado a cada poço em placas de microtitulação de 96 poços estéreis (n=3) (Fisher Scientific, NY, USA). As placas de cultura celular contendo o microrganismo em meio de crescimento foi incubada em atmosfera apropriada a 37°C durante 5 dias, garantindo condições favoráveis ao crescimento. O meio foi trocado após 24, 48, 72 e 96 h por aspiração do meio consumido e a adição de meio fresco (200 µL)⁸⁷. Esses experimentos foram conduzidos em 3 repetições independentes.

4.3 Formação do biofilme multiespécie

A formação de película salivar ocorreu no fundo da superfície de placas de 96 poços convencionais (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil). Cinquenta microlitros de saliva foram adicionados aos poços e a placa foi mantida em agitador orbital (Incubadora 430 RD, Nova Etica, Brasil), 75 rpm a 37 °C por 4 h⁸⁶. Na sequência, alíquotas padronizadas de 200 µL da suspensão de cada espécie bacteriana foram distribuídas em cada poço, seguindo a ordem programada (24 h - *S. oralis*; 48 h - *F. nucleatum*; 72 h - *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*). Depois de adicionadas todas as cepas (72 h), as células não aderentes foram removidas por meio de aspiração de meio consumido e 200 µL de meio fresco foi adicionado para continuar a formação do biofilme. O meio de cultura foi substituído diariamente, por 4 dias, e os biofilmes foram mantidos a 37 °C em condições anaeróbias⁸⁸.

4.4 Tratamento do biofilme

Após a formação dos biofilmes monoespécie e multiespécie, estes foram tratados com protocolos que incluem utilização ou não de luz e fotossensibilizador (100 μ L). As doses e concentrações foram estabelecidas com base nos resultados do estudo preliminar, já publicado⁸⁹. Todos os grupos com fotossensibilizador foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Posteriormente, os grupos submetidos à luz foram irradiados com led azul e vermelho (Biotable, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil. 22 mW/cm² sob comprimento de onda de excitação de 450 nm, azul, por 22 min e 40 s, e 19 mW/cm² sob 660 nm, vermelho, por 26 min e 20 s, totalizando uma dose de 60J/cm² para ambos os comprimentos de onda). A placa sem irradiação de luz foi mantida no escuro pelo mesmo tempo que os grupos irradiados, com o objetivo de detectar possível toxicidade no escuro. Os grupos estão descritos no quadro a seguir (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição dos grupos de estudo e protocolo experimental

	GRUPOS	CLORINA e6 (μM)	LUZ (J/cm²)
1	Controle Negativo (DMSO 1%)	0	0
2	Controle Positivo (CHX 0,2%)	0	0
3	Clorina-1	100	0
4	Clorina-2	200	0
5	Led Azul – 450 nm (a)	0	30
6	<u>aPDTa-1</u>	100	30
7	<u>aPDTa-2</u>	200	30
8	Led Vermelha – 660 nm (v)	0	30
9	<u>aPDTv-1</u>	100	30
10	<u>aPDTv-2</u>	200	30

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Extração do DNA

Após tratamento, o biofilme foi lavado e submetido a extração de DNA usando PMA (propidium monoazida) (Biotium, EUA), um corante de ligação de DNA fotoreativo utilizado para detectar microrganismos viáveis por qPCR. Após a fotólise, o PMA modifica seletivamente (uma vez que é impermeável à membrana celular intacta) o DNA das bactérias mortas, sem causar danos às bactérias viáveis. O uso de PMA permitiu a amplificação apenas de DNA de bactérias viáveis. A extração do DNA foi realizada usando o QIAamp DNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante.

4.6 Análise por PCR em tempo real

As reações de quantificação por qPCR foram realizadas no equipamento CFX96 real-time system equipment (BioRad, Hercules, CA). O sistema Taqman com primers e sondas específicos foi utilizado (**Quadro 2**). Para as reações de Taqman foram usados 12,5 µL de Mastermix (Eurogentec, Seraing, Bélgica), 4,5 µL de H₂O estéril, 1 µL de cada primer e sonda e 5 µL de cada amostra. Primers e sondas foram utilizados em diferentes concentrações, dependendo das bactérias. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 60s a 60 °C. A quantificação foi baseada em curva padrão de plasmídeos⁸⁶. Esse experimento foi conduzido em triplicata, em 3 repetições independentes (n=9).

4.7 Análise estatística

Três experimentos independentes foram realizados em triplicata em momentos diferentes para análise por UFC/mL e qPCR. Assim, um total de nove poços foram obtidos para cada grupo (n = 9). A distribuição dos dados foi checada por meio de análise da estatística descritiva e teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Os dados do biofilme monoespécie foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn para comparação entre os grupos experimentais e o controle. Os dados do biofilme multiespécie foram submetidos a análise de variância unilateral (ANOVA), teste post hoc de Dunnett para comparação entre os grupos

experimentais e o controle, e teste post hoc de Tukey para comparação dos diferentes grupos entre si. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo considerado nível de significância de 5%.

Quadro 2 - Primers e Sondas usados para detecção e quantificação de PMA-qPCR

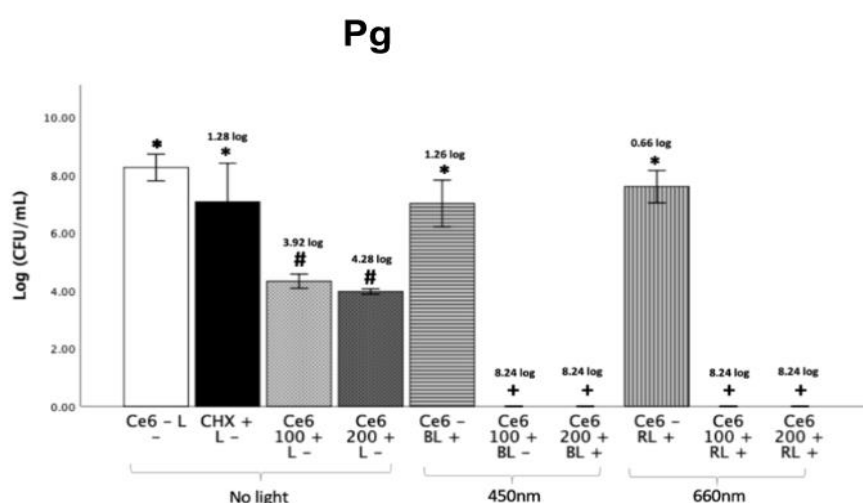
Cepa bacteriana		Primer/Sondas(5'-3')	Comprimento do fragmento
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Forward	GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA	80 bp
	Reverse	TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC	
	Probe	AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG	
<i>F. nucleatum</i>	Forward	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	162 bp
	Reverse	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA	
	Probe	CTC TAC ACT TGT AGT TCC G	
<i>P. gingivalis</i>	Forward	GCG CTC AAC GTT CAG CC	68 bp
	Reverse	CAC GAA TTC CGC CTG C	
	Probe	CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA	
	Reverse	ACC GTA ACG TGG GAA AAC TG	
	Probe	GTA GCG TCA GAG TGG TTG AC	
<i>S. oralis</i>	Forward	ACC AGC AGA TAC GAA AGA AGC AT	229 bp
	Reverse	AGG TTC GGG CAA GCG ATC TTT CT	
	Probe	AAG GCT GCT GTT GCT GAA GAA GT	

Fonte: Herrero et al.⁹⁰ (2018).

5 RESULTADOS

Com relação ao biofilme monoespécie, a aplicação da aPDT mediada pelo fotossensibilizador Ce6, em ambos os comprimentos de onda (azul e vermelho), resultou na eliminação total de bactérias viáveis, independentemente da concentração de Ce6 usada (Figura 1).

Figura 1 – Efeito dos comprimentos de onda (450 e 660 nm) irradiados sobre duas concentrações de clorina-e6 em biofilme monoespécie



Efeito da luz e duas concentrações (100 mM e 200 mM) de clorina-e6 irradiada por 450 e 660 nm em biofilme simples de *P. gingivalis*. Contagem bacteriana após tratamento está expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Símbolos diferentes representam diferença significativa em comparação com o grupo controle negativo ($p < 0.05$). Os dados representam a média e $\pm$ DP de três ensaios independentes realizados em triplicata em momentos diferentes.

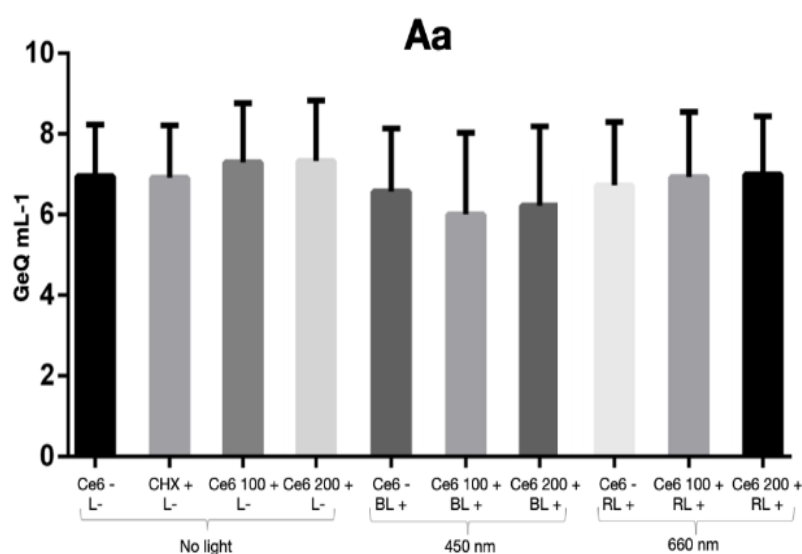
Fonte: Elaboração própria.

5.1 Biofilme multiespécie

Os resultados do qPCR estão ilustrados nas Figuras 2- 5. Uma tendência de redução bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foi observada quando a Ce6 foi aplicada e ativada em comprimento de onda de 450 nm. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos de tratamento para ambas as cepas. Para *P. gingivalis*, apenas os grupos que receberam Ce6 nas duas concentrações (100 e 200 mM) sob luz azul apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle

(asterisco branco). Estes grupos também apresentaram diferenças quando comparados ao uso do fotossensibilizador ativado por luz vermelha, o que indica melhor atividade do fotossensibilizador ativado com luz azul para este microrganismo. Não foram observadas reduções estatisticamente significantes entre as duas concentrações de Ce6 testadas.

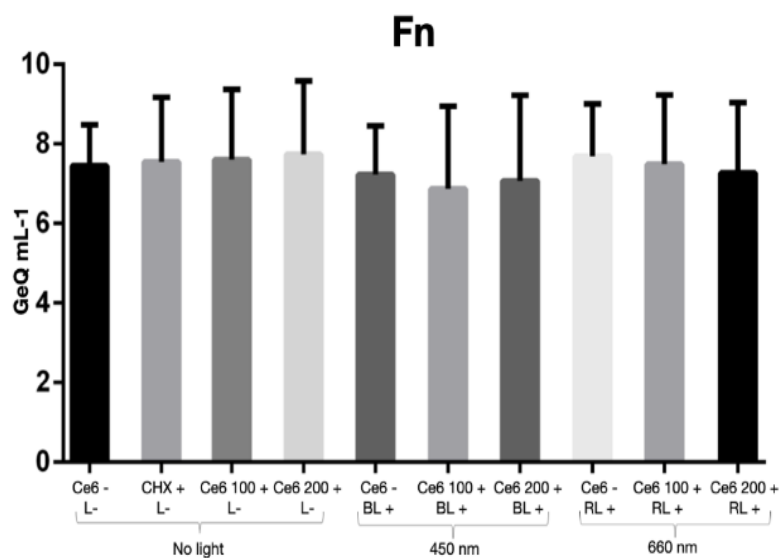
Figura 2 – Efeito dos comprimentos de onda (450 e 660 nm) irradiados sobre duas concentrações de clorina-e6 em *A. actinomycetemcomitans*



Efeito da luz e duas concentrações (100 mM e 200 mM) de clorina-e6 irradiada por 450 e 660 nm em *A. actinomycetemcomitans*. Os dados representam a média e $\pm$ DP de três ensaios independentes realizados em triplicata em momentos diferentes ($p=0,776$).

Fonte: Elaboração própria.

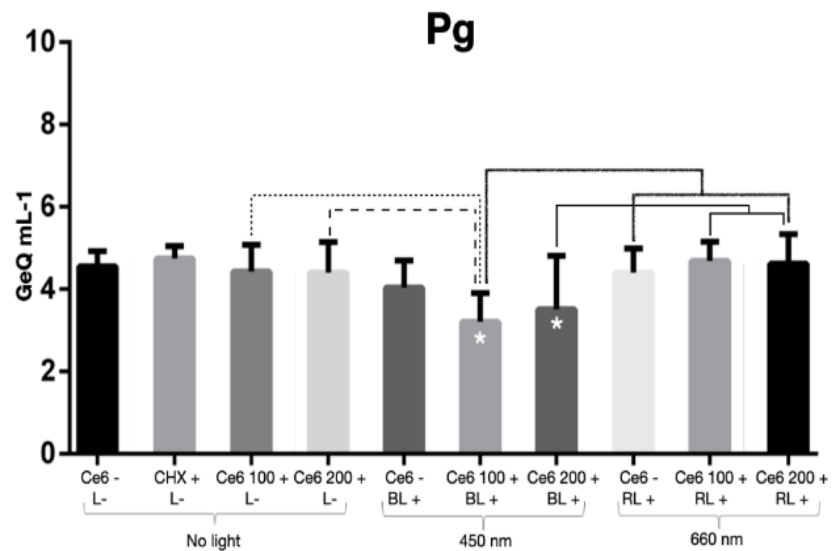
Figura 3 – Efeito dos comprimentos de onda (450 e 660 nm) irradiados sobre duas concentrações de clorina-e6 em *F. nucleatum*



Efeito da luz e duas concentrações (100 mM e 200 mM) de clorina-e6 irradiada por 450 e 660 nm em *F. nucleatum*. Os dados representam a média e $\pm$ DP de três ensaios independentes realizados em triplicata em momentos diferentes ($p=0,988$).

Fonte: Elaboração própria.

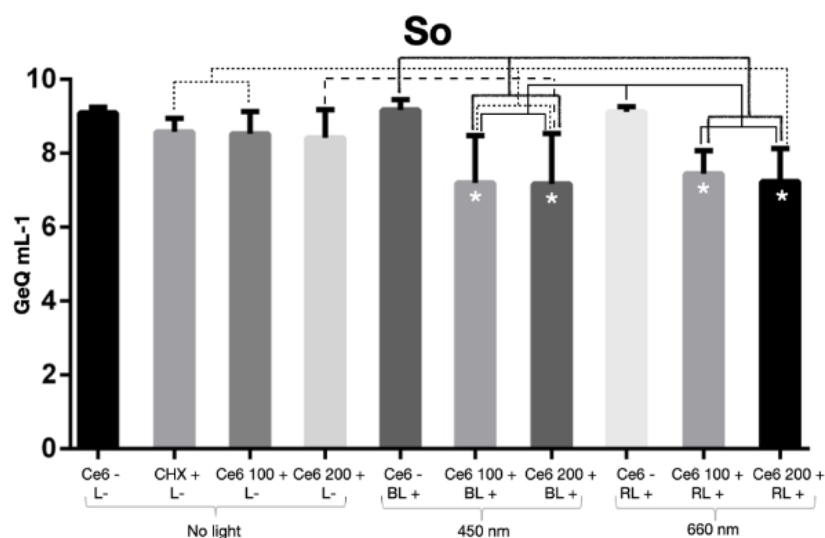
Figura 4 – Efeito dos comprimentos de onda (450 e 660 nm) irradiados sobre duas concentrações de clorina-e6 em *P. gingivalis*



Efeito da luz e duas concentrações (100 mM e 200 mM) de clorina-e6 irradiada por 450 e 660 nm em *P. gingivalis*. Linhas conectando grupos representam diferenças entre os grupos, asteriscos brancos representam diferenças entre na comparação com o grupo controle. Os dados representam a média e $\pm$ DP de três ensaios independentes realizados em triplicata em momentos diferentes ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 – Efeito dos comprimentos de onda (450 e 660 nm) irradiados sobre duas concentrações de clorina-e6 em *S. oralis* ($p < 0,05$)



Efeito da luz e duas concentrações (100 mM e 200 mM) de clorina-e6 irradiada por 450 e 660 nm em *S. oralis* ($p < 0,05$). Linhas conectando grupos representam diferenças entre os grupos, asteriscos brancos representam diferenças entre na comparação com o grupo controle. Os dados representam a média e $\pm$ DP de três ensaios independentes realizados em triplicata em momentos diferentes ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

Para *S. oralis*, os grupos que receberam a terapia fotodinâmica (aPDT) de fato, fotossensibilizador + luz, seja ela azul ou vermelha, apresentaram reduções estatisticamente significantes quando comparados ao controle (asterisco branco), também observamos diferenças destes (aPDT) quando comparados aos grupos que receberam clorexidina, e fotossensibilizador sem luz e/ou luz sem fotossensibilizador. Os grupos que receberam a aPDT mediada por luz azul apresentaram maior redução (estatisticamente significativa) que os grupos que receberam aPDT mediada por luz vermelha. Também não foram observadas diferenças entre as duas concentrações de fotossensibilizadores.

6 DISCUSSÃO

A utilização da aPDT na Odontologia, mais especificamente na Periodontia, está diretamente associada ao controle microbiano, sendo uma ferramenta eficaz no tratamento por agir diretamente no sítio-alvo, evitando assim o uso de altas concentrações de fármacos (antibióticos e antissépticos) e reduzindo a possibilidade de uma resistência bacteriana.

É importante salientar que a aPDT não é um tratamento substituto da Raspagem e Alisamento Radicular (RAR), mas sim um tratamento complementar e coadjuvante para eliminação de microrganismos patogênicos e resistentes. Segundo resultados de uma revisão sistemática com metanálise⁹¹, a aPDT sozinha não proporciona eficácia superior no tratamento da doença periodontal quando comparada à RAR. De acordo com esse estudo, não existem evidências suficientes para embasar a utilização da aPDT isoladamente como alternativa à RAR no tratamento da doença periodontal. No entanto, o seu uso coadjuvante à RAR apresentou benefícios em curto prazo.

Os fotossensibilizadores mais utilizados na aPDT para tratamento da doença periodontal são o azul de metileno e azul de toluidina²⁷⁻³³. De maneira geral, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da aPDT com utilização da clorina-e6 como fotossensibilizador e contra microrganismos associados à doença periodontal. Além disso, não há registros de estudos que avaliaram o efeito deste fotossensibilizador em microrganismos quando excitado por luz azul. Assim, este estudo foi desenhado para testar a eficácia da aPDT contra patógenos periodontais organizados em biofilmes, pois é sabido que os biofilmes são muito mais difíceis de erradicar do que as bactérias planctônicas.

No primeiro trabalho desenvolvido durante Iniciação Científica (Relatório Científico 02, enviado em 10/08/2020), verificamos que a aPDT com uso da clorina-e6 demonstrou ser um método eficaz na eliminação de *A. actinomycetemcomitans*. A aplicação de aPDT com utilização da clorina-e6 resultou na redução significativa da contagem de *A. actinomycetemcomitans*, sendo este efeito mais expressivo para a luz azul (3,89 e 4,01 log₁₀ respectivamente para menor e maior concentração do fotossensibilizador) do que para a luz vermelha (0,99 e 1,03 log₁₀, respectivamente para menor e maior concentração do fotossensibilizador). A eliminação bacteriana de pelo menos 3 log₁₀ é considerada biologicamente relevante de acordo com diretrizes

da Americana Society for Microbiology⁹². Nossos dados revelaram que a aPDT mediada pela clorina-e6, tanto na concentração de 100 como de 200 μM , foi capaz de reduzir em mais de 3 $\log_{10}$ a contagem de *A. actinomycetemcomitans* quando utilizada a luz azul. Frente a estes resultados, propusemos o presente trabalho com o intuito de investigar o efeito da aPDT com utilização da clorina-e6 em biofilme simples de *P. gingivalis* e biofilme multiespécie contendo os microrganismos *S. oralis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

Os resultados obtidos para o biofilme simples de *P. gingivalis* foram superiores aos obtidos para o biofilme de *A. actinomycetemcomitans*. A aPDT com utilização da clorina-e6 resultou na eliminação total dos microrganismos em ambas as concentrações testadas tanto para a irradiação com a luz vermelha como para a luz azul. A expressiva eliminação bacteriana detectada para a cepa *P. gingivalis* pode ser resultado de uma limitação na formação do biofilme de espécie única de *P. gingivalis* ou pode também estar associada ao seu corante fotossensibilizador intrínseco. A *P. gingivalis* é um colonizador tardio que requer a presença prévia de receptores fornecidos pelos colonizadores de estágio intermediário para estabelecer uma forte adesão ao biofilme em desenvolvimento⁹³. Os substratos de poliestireno são diferentes da superfície do dente em que ocorre o desenvolvimento de biofilmes periodontais. Além disso, um potencial efeito fotodinâmico de um pigmento intracelular de *P. gingivalis* foi recentemente descoberto quando irradiado a 460 nm. Pesquisadores afirmaram que a irradiação com luz azul em *P. gingivalis* é potencialmente bactericida⁴².

De maneira geral, nossos resultados são coerentes com resultados anteriores que mostraram uma redução de 3 $\log_{10}$ após aPDT mediada por Ce6, usando luz visível mais infravermelho-A filtrado por água (vis + wIRA), para biofilme de *F. nucleatum*⁴², e 4-5 $\log_{10}$ para biofilme de *F. nucleatum* e biofilme de *P. gingivalis*⁹⁴.

Por outro lado, uma menor redução foi observada para biofilmes de *F. nucleatum* (1,12 $\log_{10}$) e *P. gingivalis* (2,66 $\log_{10}$) com utilização de um fotossensibilizador do tipo clorina disponível comercialmente (Photodithazine® - PDZ) irradiado por luz vermelha (660 nm)⁹⁵. Essa diferença pode ser explicada pela composição do PDZ que não é claramente divulgada.

Também é importante destacar que uma maior eliminação bacteriana foi alcançada nos grupos em que a aPDT foi realizada em comparação com a clorexidina que é considerada o agente antimicrobiano padrão ouro na Periodontia. Devido a sua

alta substantividade, a clorexidina possui efeitos bacteriostáticos e bactericidas prolongados na cavidade bucal. Assim, vale ressaltar que em nosso estudo o biofilme foi lavado e a diluição foi incubada imediatamente após o tratamento. A clorexidina poderia, então, ter um efeito maior em uma análise de crescimento ou formação de biofilme pós-tratamento⁹⁶.

No biofilme multiespécie, *S. oralis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* foram selecionados como bactérias representantes que contribuem para o desenvolvimento de um biofilme subgengival de alta virulência considerados nos estágios inicial, intermediário e tardio, respectivamente⁹⁷. Nossos resultados demonstram uma tendência de redução bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* com aplicação da aPDT com clorina-e6 no comprimento de onda de 450 nm. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com aPDT e os demais grupos de tratamento para ambas as cepas. Para *P. gingivalis*, apenas os grupos que receberam Ce6 nas duas concentrações (100 e 200 mM) sob luz azul apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. Estes grupos também apresentaram diferenças quando comparados ao uso do fotossensibilizador ativado por luz vermelha. Estes achados indicam melhor atividade do fotossensibilizador ativado com luz azul para este microrganismo, o que também foi verificado em nosso experimento com biofilme monoespécie. Para *S. oralis*, os grupos que receberam aPDT, tanto na luz azul como na vermelha, apresentaram redução bacteriana significativa quando comparados ao grupo controle e clorexidina. A eficácia da aPDT mediada por luz azul também foi maior que para a luz vermelha para esta bactéria. No geral, o efeito da aPDT no biofilme multiespécie foi mais evidente para as bactérias *S. oralis* e *P. gingivalis*. No caso da *S. oralis*, o resultado poderia ser explicado pela maior suscetibilidade das bactérias Gram-positivas que apresentam porosidades na parede celular^{98,99}. No caso da *P. gingivalis*, o resultado foi condizente com a eliminação total observada no biofilme simples. Os resultados obtidos para o biofilme multiespécie são bastante interessantes, pois a aPDT com utilização da clorina-e6 teve efeito significativo na redução bacteriana mesmo em um biofilme mais organizado e complexo. Clinicamente espera-se um resultado ainda maior pois o biofilme é desorganizado mecanicamente, por meio da RAR, antes da aplicação da aPDT.

O efeito bactericida sob exposição à luz parece ser diretamente proporcional à concentração do fármaco. No entanto, não observamos uma correlação entre a eliminação bacteriana e a concentração do fotossensibilizador. Essa ocorrência também foi observada em estudo recente⁹⁵. Assim, com base em nossos resultados, o uso da concentração de 200 μM não é suportado, uma vez que não houve diferença estatística entre a maior e a menor dose da clorina-e6.

Apesar do modelo de biofilme in vitro apresentar suas limitações, os resultados obtidos em nossos estudos são relevantes para apoiar novos experimentos e para seguir para aplicação clínica da clorina-e6 como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, a aPDT com utilização da clorina-e6 pode ser uma terapia adjuvante promissora no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal. O uso da aPDT mediado por clorina-e6 em ambos os comprimentos de onda promoveu eliminação bacteriana total no biofilme simples de *P. gingivalis* e resultou na redução da contagem bacteriana de todas as espécies do biofilme multiespécie, sendo este efeito mais evidente para *S. oralis* e *P. gingivalis* quando irradiadas pela luz azul.

REFERÊNCIAS*

1. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, Periodontia clínica. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; 38: 135-87.
3. 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.
4. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000. 2004; 36: 59-97.
5. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. Periodontol 2000. 2009; 51: 109-40.
6. Muniz FW, de Oliveira CC, de Sousa Carvalho R, Moreira MM, de Moraes ME, Martins RS. Azithromycin: a new concept in adjuvant treatment of periodontitis. Eur J Pharmacol. 2013; 705(1-3): 135-9.
7. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by Porphyromonas gingivalis. Front Biosci. 2007; 12: 3965-74.
8. Theodoro LH, Garcia VG, Ervolino E. Efeitos da terapia fotodinâmica na periodontia. In: Romito GA, Holzhausen M, Saraiva L, Pannuti CM, Villar CC. Estratégias terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e peri-implantar. Nova Odessa: Napoleão; 2017. p. 375-87.
9. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. J Clin Periodontol. 1990; 17(7): 479-93.
10. Van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, Delleman-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. 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.
11. Fontana CR. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2007.

* 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>

12. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010; 81(7): 975-81.
13. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(12): 1106-14.
14. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP 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.
15. 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.
16. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, Bosco AF et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(1): 143-50.
17. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013; 84(4): 556-65.
18. Garcia VG, Longo M, Gualberto Junior EC, Bosco AF, Nagata MJH, Ervolino E 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.
19. 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.
20. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Bharmappa R 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): ZC08-12.
21. Salgado DMRA, Noro-Filho GA, Cortes ARG, Arita ES, Casarin RCV, Costa C et al. Effect of photodynamic therapy with malachite green on non-surgical periodontal treatment in HIV patients: a pilot split-mouth study. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(5): 1213-17.
22. 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. p. 252-81.

23. MP 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.
24. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4): 250-81.
25. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, *Photodiagn Photodyn Ther.* 2005; 2(3): 175-91.
26. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells that can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991; 53(4): 549-53.
27. 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.
28. 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.
29. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. 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): 681-8.
30. Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LM, Adabo MD, Lopes T, do Carmo TH et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(1): 87-91.
31. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP 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.
32. 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.
33. Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 801-7.
34. Petelin M, Perkic K, Seme K, Gaspirc 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.

35. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, Azaripour A 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.
36. Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, 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): 1222-29.
37. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009; 6(2): 94-6.
38. Wang L-X, Li J-W, Huang J-Y, Li J-H, Zhang L-J, O'Shea D et al. Antitumor activity of photodynamic therapy with a chlorin derivative in vitro and in vivo. *Tumour Biol*. 2015; 36(9): 6839-47.
39. Nishie H, Kataoka H, Yano S, Yamaguchi 4, Nomoto A, Tanaka M 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.
40. Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa M, Pietruski JK, Dolińska E et al. Clinical evaluation of photodynamic therapy efficacy in the treatment of oral leukoplakia. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11(1): 34-40.
41. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(1): 59-66.
42. 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 (chlorine6). *Pol J Microbiol*. 2005; 54(4): 305-10.
43. 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.
44. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(10): 2595-601.
45. Silva JC, Ferreira-Strixino J, Fontana LC, Paula LM, Raniero L, Martin AA et al. Apoptosis associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(4): 1429-36.
46. Huang L, Wang M, Huang YY, El-Hussein A, Wolf LM, Chiang LY et al. Progressive cationic functionalization of chlorin derivatives for antimicrobial photodynamic inactivation and related vancomycin conjugates. *Photochem Photobiol Sci*. 2018; 17(5): 638-651.

47. Shakhova M, Loginova D, Meller A, Sapunov D, Orlinskaya N, Shakhov A et al. Photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer at 405 nm: numerical, morphological, and clinical study. *J Biomed Opt.* 2018; 23(9): 1-9.
48. Paul S, Heng PWS, Chan LW. Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy. *J Fluoresc.* 2013; 23(2): 283-91.
49. 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.
50. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10): 2595-601.
51. 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.
52. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(7): 979-86.
53. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Growth rate and the resistance of Gram-negative biofilms to cefrimide. *J Antimicrob Chemother.* 1990; 26(4): 473-8.
54. Tavares LJ, Klein MI, Panariello BHD, Dorigatti de Avila E, Pavarina AC. An in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in single and dual species biofilms. *J Periodontal Implant Sci.* 2018; 48(1): 12-21.
55. Corrêa MG, Oliveira DH, Saraceni CH, Ribeiro FV, Pimentel SP, Cirano FR et al. Short-term microbiological effects of photodynamic therapy in non-surgical periodontal treatment of residual pockets: a split-mouth RCT. *Lasers Surg Med.* 2016; 48(10): 944-950.
56. CP Eduardo, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Ryoung Lee EM, Aranha AC. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. *Rev. Assoc. Paulo. Cir. Dente.* 2015; 69(3): 226-35.
57. 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.
58. 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): 573–81.
59. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med.* 2012; 8:12

60. Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2015; 86(3): 376-86.
61. Malgikar S, Reddy SH, Sagar S V, Satyanarayana D, Reddy G V, Josephin JJ. Clinical effects of photodynamic and lowlevel laser therapies as an adjunct to scaling and root planing of chronic periodontitis: a split-mouth randomized controlled clinical trial. *Indian J D Res*. 2016; 27(2): 121-6.
62. Bundidpun P, Srisuwantha R, Laosrisin N. Clinical effects of photodynamic therapy as an adjunct to full-mouth ultrasonic scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis. *Laser Ther*. 2018; 27(1): 33-39.
63. Raut CP, Sethi KS, Kohale BR, Mamajiwala A, Warang A. Indocyanine green-mediated photothermal therapy in treatment of chronic periodontitis: a clinico-microbiological study. *J Indian Soc Periodontol*. 2018; 22(3): 221-7.
64. Ivanaga CA, Miessi DMJ, Nuernberg MAA, Claudio MM, Garcia VG, Theodoro LH. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: a randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 27: 388-395
65. Joshi K, Baiju CS, Khashu H, Bansal S. Clinical effectiveness of indocyanine green mediated antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to scaling root planing in treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101591.
66. Sethi KS, Raut CP. Antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green as a photosensitizer in treatment of chronic periodontitis: a clinico-microbial study. *Indian J Dent Res*. 2019; 30(6): 870-6.
67. Al-Khureif AA, Mohamed BA, Siddiqui AZ, Khan AA, Divakar DD. Repeated application of photodynamic and antibiotic therapy as an adjunct to root surface debridement in patients with grade C and stage III or IV aggressive periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101610.
68. Harmouche L, Courval A, Mathieu A, Petit C, Huck O, Severac F et al. Impact of tooth-related factors on photodynamic therapy effectiveness during active periodontal therapy: a 6-months split-mouth randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 27:167-72.
69. Niazi FH, Noushad M, Tanvir SB, Ali S, Al-Khalifa KS, Qamar Z et al. Antimicrobial efficacy of indocyanine green-mediated photodynamic therapy compared with *Salvadora persica* gel application in the treatment of moderate and deep pockets in periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101665.

70. Al-Momani MM. Indocyanine-mediated antimicrobial photodynamic therapy promotes superior clinical effects in stage III and grade C chronic periodontitis among controlled and uncontrolled diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 35: 102379.
71. Cláudio MM, Nuernberg MAA, Rodrigues JVS, Belizário LCG, Batista JA, Duque C et al. Effects of multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of periodontitis in patients with uncompensated type 2 diabetes: a randomized controlled clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 35: 102451.
72. Luchesi VH, Pimentel SP, Kolbe MF, Ribeiro FV, Casarin RC, Nociti Jr FH et al. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(8): 781-8.
73. Segarra-Vidal M, Guerra-Ojeda S, Vallés LS, Lopes Roldan 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.
74. Hill G, Dehn C, Hinze AV, Frentzen M, Meister J. Indocyanine green-based adjunctive antimicrobial photodynamic therapy for treating chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 26: 29-35.
75. Dilsiz A, Canakci V, Aydin T. Clinical effects of potassium-titanyl-phosphate laser and photodynamic therapy on outcomes of treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013; 84(3): 278-86.
76. Balata ML, Andrade LP, Santos DB, Cavalcanti NA, Tunes UR, Ribeiro EP et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(2): 208-14.
77. Chitsazi MT, Shirmohammadi A, Pourabbas R, Abolfazli N, Farhoudi I, Daghigh Azar B et al. Clinical and microbiological effects of Pphotodynamic therapy associated with non-surgical treatment in aggressive periodontitis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2014; 8(3): 153-9.
78. Dos Santos NC, Andere NM, Araujo CF, Marco AC, Dos Santos LM, Jardini MA et al. Local adjunct effect of antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of chronic periodontitis in type 2 diabetics: split-mouth double-blind randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(8): 1633-40.
79. Al-Askar M, Al-Kheraif AA, Ahmed HB, Kellesarian SV, Malmstrom H, Javed F. Effectiveness of mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of periodontal inflammation among patients with prediabetes. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2017; 20: 91-94.

80. Katsikanis F, Strakas D, Vouros I. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT, 670 nm) and diode laser (940 nm) as adjunctive approach in the conventional cause-related treatment of chronic periodontal disease: a randomized controlled split-mouth clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(5): 1821-27.
81. AlAhmari F, Ahmed HB, Al-Kheraif AA, Javed F, Akram Z. Effectiveness of scaling and root planning with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis among cigarette-smokers and never-smokers: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 25: 247-52.
82. Sena IAA, Silva DNA, Azevedo MLDS, da Silva NT, Longo JPF, Moraes M et al. Antimicrobial photodynamic therapy using a chloro-aluminum phthalocyanine adjuvant to nonsurgical periodontal treatment does not improve clinical parameters in patients with chronic periodontitis. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019; 37(11): 729-35.
83. de Melo Soares MS, D'Almeida Borges C, de Mendonça Invernici M, Frantz FG, Figueiredo LC, de Souza SLS et al. Antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(8): 3173-82.
84. de Araújo Silva DN, Silva NTD, Sena IAA, Azevedo MLDS, Júnior FLDS, Silva RCMD, Vasconcelos RC, de Moraes M, Longo JPF et al. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy with chloro-aluminum phthalocyanine on periodontal clinical parameters and salivary GSH and MDA levels in patients with periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 31: 101843.
85. Rahman S, Gv G, Mehta DS. A clinico-microbiological and biochemical study evaluating the adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy and local drug delivery of 1.2 % simvastatin gel compared to scaling and root planing alone. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32: 102017.
86. Tavares LJ, de Avila ED, Klein MI, Panariello BHD, Spolidório DMP, Pavarina AC 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.
87. 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.
88. Ramage G, Lappin DF, Millhouse E, Malcolm J, Jose A, Yang J et al. The epithelial cell response to health and disease associated oral biofilm models. *J Periodontal Res.* 2017; 52(3): 325-33.

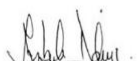
89. Carvalho GG, Sanchez Puetate JC, Donatoni MC, Huacho PMM, Rastelli ANS, Oliveira KT et al. Photodynamic inactivation using a chlorin-based photosensitizer with blue or red-light irradiation against single-species biofilms related to periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 31: 101916.
90. Herrero ER, Fernandes S, Verspecht T, Ugarte-Berzal E, Boon N, Proost P et al. Dysbiotic biofilms deregulate the periodontal inflammatory response. *J Dent Res*. 2018; 97(5): 547-555.
91. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(2): 669-82.
92. 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.
93. 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. p.252-81.
94. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP 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.
95. Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti Jr FH 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.
96. 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.
97. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1981; 8(1): 57-72.
98. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(1): 59-66.
99. 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.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO: REUNIÃO ANUAL SBPQO VIRTUAL 2020



Certificamos que o trabalho **PI0010 - TERAPIA FOTODINÂMICA COM UTILIZAÇÃO DA CLORINA-E6 SOBRE BIOFILME DE *A. ACTINOMYCETEMCOMITANS*** de Perroni RM*, Lessa JB, Carvalho GG, Sanchez-Puetate JC, Maquera-Huacho PM, Spolidorio DMP, Zandim-Barcelos DL foi apresentado **na modalidade Pannel Iniciante**

na 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
no período de 09 a 12 de Setembro de 2020


Isabela Almeida Pordeus
Presidente


Paulo Francisco César
Vice-Presidente

ANEXO B - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO (CO-AUTOR): REUNIÃO ANUAL SBPQO VIRTUAL 2020



Certificamos que o trabalho **PI0310 - TERAPIA FOTODINÂMICA COM UTILIZAÇÃO DA CLORINA-E6 SOBRE BIOFILME DE *P. GINGIVALIS*** de Lessa JB*, Perroni RM, Carvalho GG, Sanchez-Puetate JC, Maquera-Huacho PM, Spolidorio DMP, Zandim-Barcelos DL foi apresentado **na modalidade Painel Iniciante**

na 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
no período de 09 a 12 de Setembro de 2020


Isabela Almeida Pordeus
Presidente


Paulo Francisco César
Vice-Presidente