

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de 04/02/2027

AMANDA PAINO SANT’ANA

**BuTB as a novel photosensitizer for aPDT against polymicrobial
biofilms on titanium implants: Insights into peri-implantitis
treatment**

**Araçatuba - SP
2025**

AMANDA PAINO SANT'ANA

**BuTB as a novel photosensitizer for aPDT against polymicrobial
biofilms on titanium implants: Insights into peri-implantitis
treatment**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientadora: Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro

Coorientadora: Profa. Dra. Erica Dorigatti de Avila

**Araçatuba - SP
2025**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S232b Sant'Ana, Amanda Paino.
BuTB as a novel photosensitizer for aPDT against
polymicrobial biofilms on titanium implants : insights into peri-
implantitis treatment / Amanda Paino Sant'Ana. - Araçatuba,
2025
93 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção
Coorientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro
Coorientadora: Profa. Erica Dorigatti de Avila

1. Peri-implantite 2. Fotoquimioterapia 3. Fármacos fotos-
sensibilizantes 4. Biofilmes I. T.

Black D3
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico esta conquista aos grandes amores da minha vida:

Meus Pais

Meus pais são tudo para mim! São meu alicerce e meu maior exemplo de amor incondicional. É com eles que passo cada fim de tarde, no telefone, contando tudo o que aconteceu no meu dia e ouvindo o dia deles também. Passamos por grandes desafios mas sempre superamos juntos, pela misericórdia de Deus. Eu devo tudo a eles, pois se privaram de muitas coisas para oferecer o melhor para o meu futuro. Mãe e pai, obrigada por todo sacrifício, força e por me ensinarem o que significa lutar pelos nossos sonhos. Tudo o que eu conquistei até hoje, foi porque eu tinha vocês, me guiando, me ajudando e me dando suporte. Logo, essa conquista também não seria diferente. Essa conquista também é de vocês e por vocês! Espero poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim. Palavras não são capazes de descrever o amor que sinto por vocês. Peço a Deus todo dia para proteger vocês, que são meu coração fora do peito! Grata a Deus pela família maravilhosa que temos!

Obrigada pela nossa família! Obrigada por sempre me apoiarem e incentivarem! Obrigada por toda dedicação! Obrigada por todo amor! Obrigada por toda força e sacrifício! Obrigada por serem exemplo de luta e de vitórias! Obrigada por tudo, desde sempre e para sempre!

Aos meus amados pais,

Carlos e Silmara

Esta conquista não é minha, esta conquista é nossa!

Amo vocês infinitamente!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu protetor,

Deus

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. Josué 1:9

Deus, sinto seu amor em cada detalhe do meu dia-a-dia, nos momentos tranquilos e calmos, mas também nos períodos turbulentos. Obrigada por cuidar de cada detalhe do meu caminho, transformando obstáculos em grandes oportunidades. Obrigada por ouvir minhas orações e por nunca ter nos desamparado. Obrigada também, por sempre me cercar de pessoas boas. E muito obrigada pelas infinitas bênçãos concedidas!

A Ti toda honra e toda glória!

Aos meus avós,

Valdomiro e Neuza

(in memorian)

“Disse-lhe Jesus: Eu sou a ressurreição e a vida; quem crê em mim, ainda que esteja morto, viverá; e todo aquele que vive e crê em mim nunca morrerá”. João 11:25-26

Vocês se foram mas o amor e o legado que os senhores deixaram, permanecerão em nossos corações para sempre. Exemplos de cumplicidade e fidelidade, partiram desta vida juntos, pois nenhum dos dois conseguiria suportar a ausência do outro. Obrigada por terem sido referência para mim e para toda nossa família. Os senhores foram e sempre serão os melhores avós de todo o mundo. Obrigada por tanto! Obrigada por tudo!

Amarei eternamente!

Amanda Paiva Sant'Ana

Ao meu eterno melhor amigo,

Gean Carlos Paine Sant'Ana

Sou eternamente grata a Deus por ter um irmão mais velho e, principalmente, por esse irmão ser você! Obrigada por todos os anos de amor, amizade e cumplicidade. Obrigada por ser um exemplo em minha vida! Obrigada por ser proteção!

Somos a certeza de que nunca estaremos só!

Eu te amo para sempre!

Ao meu amado esposo,

Gabriel Mulinari dos Santos

Meu amor,

Sua chegada foi um presente de Deus em minha vida. Resposta das minhas orações, você é muito mais do que eu um dia sonhei em pedir. Meu maior incentivador a trilhar os caminhos da pós-graduação, me inspiro em você e em sua brilhante trajetória acadêmica. Ao longo do curso, você acolheu meus questionamentos, dúvidas e momentos difíceis. Também vibrou comigo a cada conquista e aprendizado. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma duvidei. Seu apoio e amor me fortalece a cada dia. Sem esse amor e cuidado, este trabalho não seria possível. Desde que nos conhecemos, eu na graduação e você no doutorado, são dias e noites estudando e trabalhando juntos, cada um em seu computador, mas sempre unidos por nossos propósitos. Que Deus abençoe a família que estamos construindo e que nosso amor e cumplicidade cresça e se solidifique.

Obrigada por ser você!

Te amo hoje, muito mais do que ontem e muito menos que amanhã!

Amanda Paine Sant'Ana

“Ser professor é a mais bela profissão que alguém pode seguir, pois semeia no presente, o futuro que há de vir”. José Gilson Lopes

Professor Dr. Wirley Gonçalves Assunção,

*Professor, gratidão por ter sido sua orientada. Muito obrigada pela maneira gentil que o senhor sempre me tratou ao longo desses anos. Com o senhor aprendi que carreira docente deve alinhar ensino, pesquisa e gestão com as habilidades clínicas. Gratidão por todos os ensinamentos durante as clínicas da graduação. Também tive a oportunidade de acompanhar de perto toda sua dedicação como Coordenador da Pós-graduação em Odontologia, abdicando muitas vezes seus próprios interesses, em prol do bem do Programa. Isso é admirável, professor. Muito obrigada pelo estímulo ao meu crescimento profissional. Agradeço por tudo, **Professor Wirley!***

Professora Dra. Letícia Helena Theodoro,

*Professora, ser sua orientada desde a época da graduação é um prazer imenso. Se segui no caminho da pós-graduação e estou aqui defendendo essa dissertação, foi porque a senhora me estimulou e acreditou em mim. Obrigada por todos os ensinamentos, orientação, carinho e por sua amizade! Com a senhora aprendi muito mais que pesquisar... durante sua gestão no CAOÉ, aprendi a ter seriedade com as decisões e uma postura firme ao lidar com as adversidades. Obrigada por me permitir conviver com a senhora em sua sala, tomando um cafezinho e observando a senhora trabalhando com muita competência. Muito obrigada por todas as oportunidades que a senhora, gentilmente, me ofereceu! Muito obrigada por tudo, **Professora Letícia!***

Professora Dra. Erica Dorigatti de Avila,

*Ter a professora Erica como orientadora, é a certeza que o trabalho seguirá todo o rigor técnico que necessita. Sempre presente, você acompanhou e delineou todos os passos que essa pesquisa seguiu. Seus “podcasts” foram ouvidos dezenas de vezes antes de cada experimento e ah... se você soubesse como são valiosos. Sua generosidade em ensinar tudo o que levou anos para aprender e sua paixão pela pesquisa são admiráveis. Com humanidade ímpar, você acolheu todos os meus questionamentos e anseios. Além de ser uma pesquisadora fantástica, estava sempre preocupada se eu e suas alunas estávamos bem. Esse cuidado foi sentido por todas nós! Muito obrigada por ter me ensinado coisas que vão além da área acadêmica. Muito obrigada por toda a troca que tivemos. Obrigada por estar sempre próxima, me ajudando em tudo o que precisei. Obrigada pelas longas conversas inspiradoras. Ter a oportunidade de ser sua aluna foi um presente em meu mestrado. Muito obrigada por tudo e por tanto, **Professora Erica!***

Queridos Mestres,

Recebam meu carinho, admiração e gratidão!

Amanda Paiva Sant'Ana

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa do diretor **Professor. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do vice-diretor **Professor. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**. Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia**, na pessoa do coordenador **Professor Dr. Wirley Gonçalves Assunção** e vice-coordenadora, **Professora Dra. Roberta Okamoto**. Sou grata às oportunidades que o Programa ofereceu durante o curso de mestrado. Muito obrigada!

Ao **Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia**, sua trajetória de vida é inspiradora! Referência no estudo do Laser, este trabalho só existe hoje pois o senhor plantou essa semente há muitos anos. E além de plantar, rega essa semente com muito trabalho e dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos e acolhimento, professor! O ensinamento de sempre deixar as portas abertas, levarei para sempre comigo. Tenho muita admiração pelo senhor! Muito obrigada por tudo, professor!

Ao **Professor Dr. Mark Wainwright**, foi uma honra e alegria poder trabalhar com um pesquisador como o senhor. Estou muito feliz e grata pela oportunidade de contribuir com essa pesquisa para o avanço da aPDT. Sem dúvidas, a presença do professor agregou em muito meu mestrado. Muito obrigada pela atenção e disponibilidade dispendida com minha pesquisa, professor!

Aos **Professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Daniela Micheline dos Santos, Débora de Barros Barbosa, Karina Helga Turcio, Aldiéres Alves Pesqueira, Aimée Maria Guiotti, Marcelo Coelho Goiato, Eduardo Passos Rocha, Fellipo Ramos Verri e Eduardo Pizza Pellizzer**, pelo convívio e pelos conhecimentos transmitidos. Aos técnicos de laboratório **Jânder de Carvalho Inácio, Eduardo Rodrigues Cobo e Carlos Alberto Gonçalves** por todas as vezes que a ajuda de vocês foi fundamental. Ao assessor administrativo **Marco Antonio Moraes Borges** pelo empenho e disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Obrigada por tudo!

Aos **Professores do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Alberto Carlos Botazzo Delbem, Juliano Pelim Pessan e Thayse Yumi Hosida**, pelo acolhimento e suporte durante a realização das análises microbiológicas. Ao servidor técnico-administrativo **Marcel Vicente da Silva**, muito obrigada por toda ajuda. Conviver em um departamento novo é sempre um desafio, mas o Marcel com seu jeito acolhedor, sempre disposto a ajudar, tornou

a rotina muito mais leve e tranquila. Estendo meus agradecimentos a todos os **alunos de pós-graduação** que frequentam o departamento por todo o auxílio durante minha estada lá. Compartilhar os dias com vocês foi enriquecedor. Muito obrigada!

As minhas amigas e companheiras de equipe, **Daniela Moreira Cunha** e **Mariana Martins Guerreiro**. Minhas companheiras de laboratório, de planos, longos experimentos, desespero, muitas risadas e alegrias. Foram dias de semana, finais de semana e feriados compartilhados. Desejo que esse laço formado em um momento tão importante de nossas vidas, como a pós-graduação, permaneça por muitos e muitos anos. Muito obrigada por todo companheirismo e toda ajuda ao longo desses anos. Muito obrigada por terem grande parte no desenvolvimento e realização deste trabalho. A **Marta Maria Alves Pererira**, muito obrigada por toda ajuda durante a realização da revisão narrativa desta dissertação. Seus conhecimentos foram extremamente valiosos. Sem vocês, nada disso seria possível! Gratidão, amigas!

Aos meus queridos amigos de pós-graduação, **Ana Livia Assonuma**, **Ana Beatriz de Souza Albergati**, **Ruan Henrique Delmonica Barra**, **Cláudia Simões**, **João Victor Rodrigues Soares**, **Mariella Boaretti**, **Arieane Barion** e **Camila Teixeira do Nascimento** por serem apoio e companhia. Alguns de vocês trago comigo desde a graduação, e como é bom ter uma amizade tão duradoura e recíproca. Tenho muito orgulho dos profissionais que vocês estão se tornando. Espero poder compartilhar muitas outras fases da minha vida com vocês. Sou grata pela nossa amizade!

À técnica **Natália Yoshie Ikegami** do **Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO)** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), pelas realização das imagens de microscopia confocal. Obrigada!

Ao químico **Rodolfo Debone Piazza** do Instituto de Química da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelas realização dos dados FTIR e UV/Vis. Obrigada!

Ao técnico **Luan Reina** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP), pelas realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura. Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização deste curso.

Aos funcionários da pós-graduação, **Cristiane Regina Lui Matos, Elis Andréa Pinto e Lucas Sousa da Rocha** pela forma atenciosa com que sempre me trataram. A dedicação e comprometimento de vocês faz toda a diferença! Muito obrigada!

Aos funcionários da biblioteca, **Ana Claudia Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Luís Cláudio Sedlacek, Denise Maeda e Maria Cláudia Benez**. Além de toda ajuda com os trabalhos de pesquisa, gostaria de agradecer pela humanidade e carinho que vocês tratam, não somente eu, mas todos os alunos da FOA. Ir em nossa biblioteca é sinônimo de conhecimento, estudo, acolhimento e conversas produtivas, inspiradoras e agradáveis. Gostaria de agradecer em especial, **Ana Claudia Grieger Manzatti**, por toda ajuda e correção deste trabalho! Muito obrigada!

Aos vigias da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Marcio e William** pelo cuidado e atenção com a nossa segurança. Obrigada!

***“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que
adquire conhecimento”***

Provérbios 3: 13

RESUMO GERAL

SANT'ANA, A. P. **BuTB como um novo fotossensibilizador para a aPDT contra biofilmes polimicrobianos em implantes de titânio: perspectivas no tratamento da peri-implantite.** 2025. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

A peri-implantite é uma doença inflamatória iniciada por um biofilme disbiótico aderido às superfícies de implantes dentários, podendo resultar na perda do implante. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), baseada no uso de um fotossensibilizador (PS) associado à luz, tem atraído atenção como um potencial tratamento adjuvante para a peri-implantite. No entanto, apesar da significativa quantidade de PSs disponíveis, a aplicação desta terapia ainda não tem sido sugerida pela Diretriz de Prática Clínica da Federação Europeia de Periodontologia em virtude do baixo número de estudos clínicos disponíveis. Dentro deste contexto, o primeiro estudo propõe uma abordagem crítica sobre os princípios químicos e biológicos subjacentes ao mecanismo de ação dos PSs que afetam o sucesso clínico do procedimento. Ainda neste tópico, exploramos potenciais modificações nos compostos dos PSs visando intensificar a sua eficácia contra biofilmes polimicrobianos. Já no segundo estudo, consideramos a necessidade de restabelecer a concentração mínima de um novo PS, o azul de butil toluidina (BuTB), capaz de inibir o crescimento de um biofilme polimicrobiano sem causar toxicidade às células humanas. Para este fim, discos de titânio (Ti) foram utilizados como substrato para simular superfícies de abutment de implante e o modelo de biofilme foi construído com base na saliva coletada de pacientes diagnosticados com peri-implantite e crescida em meio de cultura próprio. A TFDA foi aplicada sobre um biofilme inicial de 24 horas com o laser Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) com comprimento de onda de 660 nm. A capacidade antibacteriana do BuTB foi confirmada para a concentração de 0,05 mg/mL, com mais de 3 log de redução do crescimento bacteriano em comparação aos discos de Ti não tratados ($p < 0,05$), em dois tempos de pré-irradiação (1 e 5 minutos). Avaliações quantitativas e qualitativas demonstraram que o BuTB na concentração de 0,05 mg/mL e tempo de pré-irradiação de 1 minuto não afetou a atividade enzimática mitocondrial de células de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos gengivais humanos (HGF) cultivadas em monocamada. Não obstante, efeito citotóxico foi observado quando ambas as células foram expostas a um tempo de pré-irradiação de 5 minutos para a mesma concentração. Esses achados fornecem novos insights sobre o efeito do BuTB na formação de biofilme polimicrobiano e no

comportamento celular e estabelecem novos parâmetros para tornar a aPDT mais segura a experimentos sequenciais *in vivo*.

Palavras-chave: peri-implantite; fotoquimioterapia; fotossensibilizador; biofilmes.

GENERAL ABSTRACT

SANT'ANA, A. P. **BuTB as a novel photosensitizer for aPDT against polymicrobial biofilms on titanium implants: Insights into peri-implantitis treatment.** 2025. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Peri-implantitis is an inflammatory disease initiated by a dysbiotic biofilm adhered to the surfaces of dental implants, which can result in implant loss. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), based on the use of a photosensitizer (PS) associated with light, has attracted attention as a potential adjuvant treatment for peri-implantitis. However, despite the significant amount of PS available, the application of this therapy has not yet been suggested by the Clinical Practice Guideline of the European Federation of Periodontology due to the low number of clinical studies available. Within this context, the first study proposes a critical approach to the chemical and biological principles underlying the mechanism of action of PSs that affect the clinical success of the procedure. Still on this topic, we explore potential modifications in PSs compounds to intensify their efficacy against polymicrobial biofilms. In the second study, we considered the need to reestablish the minimum concentration of a new PS, butyl toluidine blue (BuTB), capable of inhibiting the growth of a polymicrobial biofilm without causing toxicity to human cells. For this purpose, titanium (Ti) discs were used as substrate to simulate implant abutment surfaces, and the biofilm model was constructed based on saliva collected from patients diagnosed with peri-implantitis and grown in own culture medium. aPDT was applied on an initial 24-hour biofilm with the Indium-Gallium-Aluminum-Phosphorus (InGaAlP) laser with a wavelength of 660 nm. The antibacterial capacity of BuTB was confirmed to be at a concentration of 0.05 mg/mL, with more than 3 log reduction in bacterial growth compared to untreated Ti discs ($p < 0.05$), at two pre-irradiation times (1 and 5 minutes). Quantitative and qualitative evaluations demonstrated that BuTB at a concentration of 0.05 mg/mL and a pre-irradiation time of 1 minute did not affect the mitochondrial enzymatic activity of keratinocyte cells (HaCaT) and human gingival fibroblasts (HGF) cultured in monolayer. Nevertheless, cytotoxic effect was observed when both cells were exposed to a pre-irradiation time of 5 minutes for the same concentration. These findings provide new insights into the effect of BuTB on polymicrobial biofilm formation and cell behavior and establish new parameters to make aPDT more safer to sequential *in vivo* experiments.

Keywords: peri-implantitis; photochemotherapy; photosensitizing agents; biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Fig. 1. This schematic illustrates how the progression of peri-implant disease, which is characterized by deeper pockets and reduced oxygen availability, may decrease the effectiveness of aPDT. The colonization of bacteria and the formation of a dysbiotic biofilm trigger an inflammatory response in the peri-implant tissue. This response recruits additional immune cells to the infection site and leads to the release of pro-inflammatory cytokines. Inflammation promotes bone resorption through the recruitment of osteoclasts. As bone resorption intensifies, peri-implant pockets deepen and oxygen levels diminish. Consequently, the increasing pathogenicity of anaerobic microorganisms further reduces the effectiveness of aPDT.

Fig. 2. Schematic representation illustrating the mechanism of action of the PS in aPDT according to diagram de Jablonski. Exposure to light takes a PS molecule from the ground singlet state to an excited singlet state. The molecule excited can transform into an excited triplet state and then form radicals through a Type I reaction or transfer its energy to molecular oxygen and form $^1\text{O}_2$, which is the main cytotoxic agent involved in aPDT.

Fig. 3. Schematic representation illustrating how photobiological damage occurs and highlighting the electrostatic and molecular interactions responsible for the binding of the PS to the bacterial cell. After the binding or penetration of the PS molecule into the bacterium, the photochemical reaction occurs, responsible for producing ROS and $^1\text{O}_2$. These reactive oxygen species then cause damage to the plasma membrane, ribosomes, and bacterial DNA.

Fig. 4. Schematic representation illustrating the molecular aggregation behavior of phenothiazine PSs (a). Image d illustrates that the asymmetry of the BuTB PS molecule reduces molecular aggregation behavior.

Capítulo 2

Fig. 1. Experimental design.

Fig. 2. Fig. 2. (A) FTIR spectra for TBO and BuTB. (B) UV/Vis absorption spectra of TBO and BuTB with maximum absorption band at 630 nm. (B') Absorption band of BuTB extending to approximately 645 nm. (C) Aqueous visible absorption by BuTB at 650 nm wavelength (grey dashes).

Fig. 3. (A) Quantitative data (mean $\pm$ SD) biofilm formation between the control (Ti) 76
and experimental groups (1 minute and 5 minutes).

Fig. 4. Effect of BuTB-mediated aPDT treatment on the viability of peri-implantitis 77
representative bacterial biofilm at 24 hours of culture via live/dead kit analysis (green
for live cells, red for dead cells).

Fig. 5. Representative images of 10x magnification laser scanning confocal 78
microscopy and 3D reconstruction of HaCaT (A) and HGF (B) cells. (A) Effect of
BuTB-mediated aPDT treatment on the viability of HaCaT cells in 24 h of culture
through live/dead kit analysis (green for live cells, red for dead cells). (B) Effect of
BuTB-mediated aPDT treatment on the viability of HGF cells in 24 hours of culture
through live/dead kit analysis (green for live cells, red for dead cells).

Fig. 6. Quantitative data (mean $\pm$ SD) of effect of BuTB-mediated aPDT on (A) 79
HaCaT and (B) HGF cell viability at 24 hours culture via measurement of alamar blue
staining as indicator of cell viability on tissue culture polystyrene between control
(Ti) and experimental (1 minute) group.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Comparative effectiveness of aPDT as adjunctive therapy in peri-implantitis 40
treatment: Microbiological and clinical insights.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	3-dimensional
aPDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy
ATP	Adenosine triphosphate
BuTB	Butyl Toluidine Blue
Ce6	Chlorine e6
DNA	Deoxyribonucleic acid
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HaCaT	Keratinocytes
HGF	Fibroblasts
ICG	Indocyanine green
InGaAlP	Indium-Gallium-Aluminum-Phosphorus
LPS	Lipopolysaccharide
MB	Methylene Blue
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OD	Optical density
PBS	Phosphate-buffered saline
PS	Photosensitizer
ROS	Reactive oxygen species
RS	Rose Bengal
SEM	Scanning Electron Microscopy
TBO	Toluidine-O blue
Ti	Titanium
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UV/Vis	absorption/transmission spectrophotometry through the ultraviolet-visible-near infrared region

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 - Photosensitizers as potential culprits for compensatory benefits of aPDT in the treatment of peri-implantitis: Unravelling the fundamental knowledge and bounded clinical applications of the aPDT	21
1.1 Abstract	21
1.2 Introduction	22
1.3 Biofilm-Mediated Inflammation: Polymicrobial Biofilm as a Critical Initiator of Peri-Implantitis	24
1.4 The Photosensitizer as a Key Driver of aPDT Success	27
1.4.1 Photochemical and Photobiological Aspects Involved in the Mechanism of Action of aPDT Mediated by PSs	28
1.4.2 Photochemical Processes	29
1.4.3 Photobiological Process	30
1.4.4 Light Inducing Photophysical Reactions	33
1.5 An Overview of Potential PSs to aPDT	34
1.5.1 Phenothiazines	34
1.5.2 Chlorins	36
1.5.3 Curcuminoids	36
1.5.4 Cyanine	37
1.5.5 Xanthenes	37
1.6 Limitations of the PS in Peri-Implantitis	38
1.7 What Advancements Have Been Made Over the Years in PSs to Address Challenges in Clinical Practice?	43
1.8 Future Prospects	46
1.9 Conclusion	47
1.10 References	47
2 CAPÍTULO 2 - BuTB as a novel photosensitizer for aPDT to fight polymicrobial biofilm formation on titanium implant material	66
2.1 Abstract	66
2.2 Introduction	67
2.3 Material and Methods	68
2.3.1 Titanium Disc Preparation	68
2.3.2 BuTB-Mediated aPDT: Photosensitizer and Light Source Properties	68

2.3.3 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Absorption Spectroscopy UV/Vis in Steady-State	69
2.3.4 Experimental Groups and Controls	69
2.3.5 Microbiological Experiments	70
2.3.5.1 Oral Microbial Community and Culture Conditions	70
2.3.5.2 Colony Forming Units (CFU/mL)	71
2.3.5.3 Confocal Laser Scanning Microscopy	71
2.3.6 Cell Experiments	71
2.3.6.1 Cell Growth Conditions and Monolayer Formation	71
2.3.6.2 Confocal Laser Scanning Microscopy	72
2.3.6.3 Alamar Blue	72
2.3.6.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)	73
2.3.7 Statistical Analysis	73
2.4 Results	74
2.4.1 BuTB has a Higher Absorption Coefficient Compared to TBO	74
2.4.2 BuTB-Mediated aPDT Reduced Bacterial Biofilm Growth on Titanium Surfaces	75
2.4.3 Effect of BuTB-Mediated aPDT on HaCaT and HGF Cell Proliferation and Morphology	77
2.5 Discussion	79
2.6 Conclusion	83
2.7 References	83
ANEXOS	93

2.6 Conclusion

BuTB showed antimicrobial activity at both pre-irradiation times with a reduction of more than 3 log in the number of colonies in relation to the sample control. In addition, although the 5 minute time had a larger antimicrobial effect, only the 1 minute time was able to have an antimicrobial effect concomitant with cell viability in both cells tested. These findings provide insight into the effect of BuTB on polymicrobial biofilm formation and cell behavior and establish new parameters to make aPDT more applicable to *in vivo* experiments.

2.7 References

- [1] Y. Yi, K.-T. Koo, F. Schwarz, H. Ben Amara, S.-J. Heo, Association of prosthetic features and peri-implantitis: A cross-sectional study, *J. Clin. Periodontol.* 47 (2020) 392–403. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13251>.
- [2] H.W. Elani, J.R. Starr, J.D. Da Silva, G.O. Gallucci, Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026, *J. Dent. Res.* 97 (2018) 1424–1430. <https://doi.org/10.1177/0022034518792567>.
- [3] P. Diaz, E. Gonzalo, L.J.G. Villagra, B. Miegimolle, M.J. Suarez, What is the prevalence of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis, *BMC Oral Health* 22 (2022) 449. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02493-8>.
- [4] J.G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, I.L.C. Chapple, S. Jepsen, K.S. Kornman, B.L. Mealey, P.N. Papapanou, M. Sanz, M.S. Tonetti, A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification, *J. Clin. Periodontol.* 45 Suppl 20 (2018) S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.
- [5] M. Romandini, C. Lima, I. Pedrinaci, A. Araoz, M.C. Soldini, M. Sanz, Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: A university-representative cross-sectional study, *Clin. Oral Implants Res.* 32 (2021) 112–122. <https://doi.org/10.1111/clr.13684>.
- [6] O. Carcuac, T. Berglundh, Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions, *J. Dent. Res.* 93 (2014) 1083–1088. <https://doi.org/10.1177/0022034514551754>.

- [7] Peri-implantitis Market Size | Industry Report, 2020-2027, (n.d). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/peri-implantitis-market> (accessed June 27, 2024).
- [8] C.-W. Wang, S. Ashnagar, R.D. Gianfilippo, M. Arnett, J. Kinney, H.-L. Wang, Laser-assisted regenerative surgical therapy for peri-implantitis: A randomized controlled clinical trial, *J. Periodontol.* 92 (2021) 378–388. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0040>.
- [9] E.D. de Avila, B.A. van Oirschot, J.J.J.P. van den Beucken, Biomaterial-based possibilities for managing peri-implantitis, *J. Periodontal Res.* 55 (2020) 165–173. <https://doi.org/10.1111/jre.12707>.
- [10] V. Mylona, E. Anagnostaki, S. Parker, M. Cronshaw, E. Lynch, M. Grootveld, Laser-Assisted aPDT Protocols in Randomized Controlled Clinical Trials in Dentistry: A Systematic Review, *Dent. J.* 8 (2020) 107. <https://doi.org/10.3390/dj8030107>.
- [11] L. Chambrone, H.-L. Wang, G.E. Romanos, Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review, *J. Periodontol.* 89 (2018) 783–803. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170172>.
- [12] A.N. de Souza Rastelli, Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) as a Disinfection and Biomodulation Approach in Implant Dentistry, *Photochem. Photobiol.* 97 (2021) 1155–1160. <https://doi.org/10.1111/php.13509>.
- [13] J.A. Shibli, A. Brugnera Junior, L.H. Theodoro, Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Periodontitis and Peri-Implantitis: What Are We Missing?, *Photobiomodulation Photomed. Laser Surg.* 39 (2021) 502–503. <https://doi.org/10.1089/photob.2021.0067>.
- [14] V.G. Garcia, M. Longo, E.C. Gualberto Júnior, A.F. Bosco, M.J.H. Nagata, E. Ervolino, L.H. Theodoro, 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. Periodontal Res.* 49 (2014) 584–594. <https://doi.org/10.1111/jre.12138>.
- [15] L.H. Theodoro, T.E. da Rocha, M. Wainwright, M.A.A. Nuernberg, E. Ervolino, E.Q.M. Souza, D.A. Brandini, V.G. Garcia, Comparative effects of different phenothiazine

- photosensitizers on experimental periodontitis treatment, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 34 (2021) 102198. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102198>.
- [16] M. Wainwright, J. Antczak, M. Baca, C. Loughran, K. Meegan, Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains, *J. Photochem. Photobiol. B* 150 (2015) 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.017>.
- [17] M. Wainwright, A. McLean, Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery, *Dyes Pigments* 136 (2017) 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.09.015>.
- [18] M. Wainwright, C. O’Kane, S. Rawthore, Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials, *J. Photochem. Photobiol. B* 160 (2016) 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.035>.
- [19] M.A.A. Nuernberg, M. Wainwright, D.M.J. Miessi, V. Scalet, M.B. Olivo, E. Ervolino, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, Effects of butyl toluidine blue photosensitizer on antimicrobial photodynamic therapy for experimental periodontitis treatment in rats, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31 (2020) 101868. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101868>.
- [20] E. Ervolino, M.B. Olivo, L.F. Toro, J. de O.A. Freire, V.F. Ganzaroli, I.Z. Guiati, M.A.A. Nuernberg, J.P.S. Franciscan, L.T. Ângelo Cintra, V.G. Garcia, M. Wainwright, L.H. Theodoro, Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 40 (2022) 103172. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103172>.
- [21] M.H. Tonin, F.C. Brites, J.R. Mariano, K.M.S. Freitas, M.A.L. Ortiz, S. Salmeron, Low-Level Laser and Antimicrobial Photodynamic Therapy Reduce Peri-implantitis-related Microorganisms Grown In Vitro, *Eur. J. Dent.* 16 (2022) 161–166. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731926>.
- [22] S. Francis, F. Iaculli, V. Perrotti, A. Piattelli, A. Quaranta, Titanium Surface Decontamination: A Systematic Review of In Vitro Comparative Studies, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 37 (2022) 76–84. <https://doi.org/10.11607/jomi.8969>.

- [23] M.N. Alasqah, Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy on dental implant surfaces: A systematic review of in vitro studies, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 25 (2019) 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.018>.
- [24] E.D. de Avila, C.E. Vergani, F.A. Mollo Junior, M.J. Junior, W. Shi, R. Lux, Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community, *J. Prosthet. Dent.* 118 (2017) 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2017.01.010>.
- [25] E.D. de Avila, A.G.B. Castro, O. Tagit, B.P. Krom, D. Löwik, A.A. van Well, L.J. Bannenberg, C.E. Vergani, J.J.J.P. van den Beucken, Anti-bacterial efficacy via drug-delivery system from layer-by-layer coating for percutaneous dental implant components, *Appl. Surf. Sci.* 488 (2019) 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.05.154>.
- [26] B.S. Verza, J.J.J.P. van den Beucken, J.V. Brandt, M. Jafelicci Junior, V.A.R. Barão, R.D. Piazza, O. Tagit, D.M.P. Spolidorio, C.E. Vergani, E.D. de Avila, A long-term controlled drug-delivery with anionic beta cyclodextrin complex in layer-by-layer coating for percutaneous implants devices, *Carbohydr. Polym.* 257 (2021) 117604. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117604>.
- [27] R.P. Evangelista, C.F. Amantino, R.C.L.R. Pietro, R. Sorrechia, R.D. Piazza, R.F.C. Marques, A.C. Tedesco, F.L. Primo, Copolymer-nanocapsules of zinc phenyl-thiophthalocyanine and amphotericin-B in association with antimicrobial photodynamic therapy (A-PDT) applications against *Candida albicans* yeasts, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 34 (2021) 102273. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102273>.
- [28] T. Berglundh, G. Armitage, M.G. Araujo, G. Avila-Ortiz, J. Blanco, P.M. Camargo, S. Chen, D. Cochran, J. Derks, E. Figuero, C.H.F. Hämmeler, L.J.A. Heitz-Mayfield, G. Huynh-Ba, V. Iacono, K.-T. Koo, F. Lambert, L. McCauley, M. Quirynen, S. Renvert, G.E. Salvi, F. Schwarz, D. Tarnow, C. Tomasi, H.-L. Wang, N. Zitzmann, Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions, *J. Clin. Periodontol.* 45 Suppl 20 (2018) S286–S291. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>.
- [29] E.D. de Avila, B.P. Lima, T. Sekiya, Y. Torii, T. Ogawa, W. Shi, R. Lux, Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium

- implant material, *Biomaterials* 67 (2015) 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.030>.
- [30] Y. Tian, X. He, M. Torralba, S. Yooseph, K.E. Nelson, R. Lux, J.S. McLean, G. Yu, W. Shi, Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities, *Mol. Oral Microbiol.* 25 (2010) 357–367. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00585.x>.
- [31] A. Edlund, Y. Yang, A.P. Hall, L. Guo, R. Lux, X. He, K.E. Nelson, K.H. Neelson, S. Yooseph, W. Shi, J.S. McLean, An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome, *Microbiome* 1 (2013) 25. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-25>.
- [32] E.D. de Avila, R.S. de Molon, B.P. Lima, R. Lux, W. Shi, M.J. Junior, D.M.P. Spolidorio, C.E. Vergani, F. de Assis Mollo Junior, Impact of Physical Chemical Characteristics of Abutment Implant Surfaces on Bacteria Adhesion, *J. Oral Implantol.* 42 (2016) 153–158. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00318>.
- [33] L.J. Tavares, E.D. de Avila, M.I. Klein, B.H.D. Panariello, D.M.P. Spolidório, A.C. Pavarina, Antimicrobial photodynamic therapy alone or in combination with antibiotic local administration against biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*, *J. Photochem. Photobiol. B* 188 (2018) 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09.010>.
- [34] N.L. Haro Chávez, E.D. de Avila, P.A. Barbugli, R.C. de Oliveira, C.C. de Foggi, E. Longo, C.E. Vergani, Promising effects of silver tungstate microcrystals on fibroblast human cells and three dimensional collagen matrix models: A novel non-cytotoxic material to fight oral disease, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 170 (2018) 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.023>.
- [35] C. Dini, B.E. Nagay, J.M. Cordeiro, N.C. da Cruz, E.C. Rangel, A.P. Ricomini-Filho, E.D. de Avila, V.A.R. Barão, UV-photofunctionalization of a biomimetic coating for dental implants application, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 110 (2020) 110657. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110657>.
- [36] Donald L Pavia, Gary M Lampman, George S Kriz, Introduction to spectroscopy: A guide for student of organic chemistry, 3rd Edition, Thomson Learning, Boston, 2001.

- [37] Y.C.M. De Waal, T.E. Vangsted, A.J. Van Winkelhoff, Systemic antibiotic therapy as an adjunct to non-surgical peri-implantitis treatment: A single-blind RCT, *J. Clin. Periodontol.* 48 (2021) 996–1006. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13464>.
- [38] A. Wilensky, L. Shapira, A. Limones, C. Martin, The efficacy of implant surface decontamination using chemicals during surgical treatment of peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis, *J. Clin. Periodontol.* 50 Suppl 26 (2023) 336–358. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13794>.
- [39] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outtersen, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, WHO Pathogens Priority List Working Group, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *Lancet Infect. Dis.* 18 (2018) 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- [40] J.-H. Fu, H.-L. Wang, Breaking the wave of peri-implantitis, *Periodontol.* 2000 84 (2020) 145–160. <https://doi.org/10.1111/prd.12335>.
- [41] J.F. Lasserre, M.C. Brex, S. Toma, Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases, *Mater. Basel Switz.* 11 (2018) 1802. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>.
- [42] C.H. Alves, K.L. Russi, N.C. Rocha, F. Bastos, M. Darrieux, T.M. Parisotto, R. Girardello, Host-microbiome interactions regarding peri-implantitis and dental implant loss, *J. Transl. Med.* 20 (2022) 425. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03636-9>.
- [43] A. Escudero, C. Carrillo-Carrión, M.C. Castillejos, E. Romero-Ben, C. Rosales-Barrios, N. Khier, Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures, *Mater. Chem. Front.* 5 (2021) 3788–3812. <https://doi.org/10.1039/D0QM00922A>.
- [44] L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka, M.R. Hamblin, Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria, *Lasers Surg. Med.* 44 (2012) 490–499. <https://doi.org/10.1002/lsm.22045>.

- [45] A. Mombelli, F. Décaillet, The characteristics of biofilms in peri-implant disease, *J. Clin. Periodontol.* 38 Suppl 11 (2011) 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x>.
- [46] G.R. Persson, S. Renvert, Cluster of bacteria associated with peri-implantitis, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 16 (2014) 783–793. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>.
- [47] A.C. Fumes, P.C. Romualdo, R.M. Monteiro, E. Watanabe, S.A.M. Corona, M.C. Borsatto, Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy with diode laser, *Lasers Med. Sci.* 33 (2018) 67–73. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2336-1>.
- [48] G.S. Furtado, M.A.B. Paschoal, L. do C. Santos Grenho, A.D.N. Lago, Does pre-irradiation time influence the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy?, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31 (2020) 101884. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101884>.
- [49] M. Giannelli, G. Landini, F. Materassi, F. Chellini, A. Antonelli, A. Tani, D. Nosi, S. Zecchi-Orlandini, G.M. Rossolini, D. Bani, Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study, *Lasers Med. Sci.* 32 (2017) 857–864. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2185-y>.
- [50] T.-C. Huang, C.-J. Chen, S.-J. Ding, C.-C. Chen, Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 25 (2019) 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.008>.
- [51] B. Azizi, A. Budimir, B. Mehmeti, S. Jakovljević, I. Bago, E. Gjorgievska, D. Gabrić, Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy and Light-Activated Disinfection Against Bacterial Species on Titanium Dental Implants, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 33 (2018) 831–837. <https://doi.org/10.11607/jomi.6423>.
- [52] M. Arshad, F. Joshan, N. Chiniforush, S. Afrasiabi, Comparative study of the effect of different exposure parameters of 635nm diode laser and toluidine blue O in eliminating *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm from titanium implant surfaces, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 45 (2024) 104012. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104012>.

- [53] A. Etemadi, A. Azizi, M. Pourhajibagher, N. Chiniforush, In Vitro Efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy With Phycocyanin and Diode Laser for the Reduction of *Porphyromonas gingivalis*, *J. Lasers Med. Sci.* 13 (2022) e55. <https://doi.org/10.34172/jlms.2022.55>.
- [54] E. Eldwakhly, S. Saadaldin, A. Aldegheishem, M. Salah Mostafa, M. Soliman, Antimicrobial Capacity and Surface Alterations Using Photodynamic Therapy and Light Activated Disinfection on Polymer-Infiltrated Ceramic Material Contaminated with Periodontal Bacteria, *Pharm. Basel Switz.* 13 (2020) 350. <https://doi.org/10.3390/ph13110350>.
- [55] A. Al-Ahmad, A. Walankiewicz, E. Hellwig, M. Follo, C. Tennert, A. Wittmer, L. Karygianni, Photoinactivation Using Visible Light Plus Water-Filtered Infrared-A (vis+wIRA) and Chlorine e6 (Ce6) Eradicates Planktonic Periodontal Pathogens and Subgingival Biofilms, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01900>.
- [56] P.A. Haag, V. Steiger-Ronay, P.R. Schmidlin, The in Vitro Antimicrobial Efficacy of PDT against Periodontopathogenic Bacteria, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 27327–27338. <https://doi.org/10.3390/ijms161126027>.
- [57] Y.-H. Lee, H.-W. Park, J.-H. Lee, H.-W. Seo, S.-Y. Lee, The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit, *Int. J. Oral Sci.* 4 (2012) 196–201. <https://doi.org/10.1038/ijos.2012.63>.
- [58] A. Alsaif, J.F. Tahmassebi, S.R. Wood, Treatment of dental plaque biofilms using photodynamic therapy: a randomised controlled study, *Eur. Arch. Paediatr. Dent. Off. J. Eur. Acad. Paediatr. Dent.* 22 (2021) 791–800. <https://doi.org/10.1007/s40368-021-00637-y>.
- [59] J.F. Tahmassebi, E. Droghda, S.R. Wood, A study of the control of oral plaque biofilms via antibacterial photodynamic therapy, *Eur. Arch. Paediatr. Dent. Off. J. Eur. Acad. Paediatr. Dent.* 16 (2015) 433–440. <https://doi.org/10.1007/s40368-014-0165-5>.
- [60] L. Sharab, R.E. Baier, S. Ciancio, T. Mang, Influence of Photodynamic Therapy on Bacterial Attachment to Titanium Surface, *J. Oral Implantol.* 47 (2021) 427–435. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-19-00344>.

- [61] B. Bueno-Silva, J. Parma-Garcia, L. Frigo, L.J. Suárez, T.T. Macedo, F.H. Uyeda, M.A.R. da C. Melo, R. Sacco, C.F. Mourão, M. Feres, J.A. Shibli, L.C. Figueiredo, Antimicrobial Activity of Methylene Blue Associated with Photodynamic Therapy: In Vitro Study in Multi-Species Oral Biofilm, *Pathog. Basel Switz.* 13 (2024) 342. <https://doi.org/10.3390/pathogens13040342>.
- [62] G.B. Cole, T.J. Bateman, T.F. Moraes, The surface lipoproteins of gram-negative bacteria: Protectors and foragers in harsh environments, *J. Biol. Chem.* 296 (2021) 100147. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.008745>.
- [63] S.S. Socransky, C. Smith, L. Martin, B.J. Paster, F.E. Dewhirst, A.E. Levin, “Checkerboard” DNA-DNA hybridization, *BioTechniques* 17 (1994) 788–792.
- [64] A.W. Giroti, Mechanisms of Photosensitization, *Photochem. Photobiol.* 38 (1983) 745–751. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb03610.x>.
- [65] R.R. Allison, C.H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 7 (2010) 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- [66] A.F. Dos Santos, A. Inague, G.S. Arini, L.F. Terra, R.A.M. Wailemann, A.C. Pimentel, M.Y. Yoshinaga, R.R. Silva, D. Severino, D.R.Q. de Almeida, V.M. Gomes, A. Bruni-Cardoso, W.R. Terra, S. Miyamoto, M.S. Baptista, L. Labriola, Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03275-2>.
- [67] J. Ji, V. Sharma, S. Qi, M.E. Guarch, P. Zhao, Z. Luo, W. Fan, Y. Wang, F. Mbabaali, D. Neculai, M.A. Esteban, J.D. McPherson, N.N. Batada, Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.* 2 (2014) 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.004>.
- [68] K. Pazmandi, Z. Agod, B.V. Kumar, A. Szabo, T. Fekete, V. Sogor, A. Veres, I. Boldogh, E. Rajnavolgyi, A. Lanyi, A. Bacsí, Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells, *Free Radic. Biol. Med.* 77 (2014) 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.028>.

- [69] T. Cc, P. B, C. M, S. Dmp, D. S, Effect of curcumin-loaded photoactivatable polymeric nanoparticle on peri-implantitis-related biofilm, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 40 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103150>.
- [70] S. Barootchi, H.-L. Wang, Peri-implant diseases: Current understanding and management, *Int. J. Oral Implantol. Berl. Ger.* 14 (2021) 263–282.
- [71] D. Rokaya, V. Srimaneepong, W. Wisitrasameewon, M. Humagain, P. Thunyakitpisal, Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment, *Eur. J. Dent.* 14 (2020) 672–682. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715779>.
- [72] P.M. Mountziaris, A.G. Mikos, Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.* 14 (2008) 179–186. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0038>.
- [73] F. Barutta, S. Bellini, M. Durazzo, G. Gruden, Novel Insight into the Mechanisms of the Bidirectional Relationship between Diabetes and Periodontitis, *Biomedicines* 10 (2022) 178. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010178>.
- [74] S.P. Pimentel, R. Shiota, F.R. Cirano, R.C.V. Casarin, V.G.A. Pecorari, M.Z. Casati, A.N. Haas, F.V. Ribeiro, Occurrence of peri-implant diseases and risk indicators at the patient and implant levels: A multilevel cross-sectional study, *J. Periodontol.* 89 (2018) 1091–1100. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0599>.
- [75] S.P. Pimentel, M. Fontes, F.V. Ribeiro, M.G. Corrêa, D. Nishii, F.R. Cirano, M.Z. Casati, R.C.V. Casarin, Smoking habit modulates peri-implant microbiome: A case-control study, *J. Periodontal Res.* 53 (2018) 983–991. <https://doi.org/10.1111/jre.12597>.
- [76] M. Longo, V. Gouveia Garcia, E. Ervolino, M.L. Ferro Alves, C. Duque, M. Wainwright, L.H. Theodoro, Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 25 (2019) 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.014>.