

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/03/2024.



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



Gabriel Garcia de Carvalho

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 e LL-37 em nanoemulsão no tratamento da doença periodontal: estudo *in vitro* e *in vivo*

Araraquara
2024



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



Gabriel Garcia de Carvalho

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 e LL-37 em nanoemulsão no tratamento da doença periodontal: estudo *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena
Palomari Spolidorio

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-
Barcelos

Araraquara

2024

C331t	Carvalho, Gabriel Garcia de Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 e LL-37 em nanoemulsão no tratamento da doença periodontal: estudo in vitro e in vivo / Gabriel Garcia de Carvalho. -- Araraquara, 2024 94 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio Coorientadora: Daniela Leal Zandim-Barcelos 1. Fotoquimioterapia. 2. Fármacos fotossensibilizantes. 3. Periodontite. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriel Garcia de Carvalho

Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 e LL-37 em nanoemulsão no tratamento da doença periodontal: estudo *in vitro* e *in vivo*

Comissão Examinadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador Profa. Dra. Telma Blanca Lombardo Bedran

3º Examinador Profa. Dra. Cristina Kurachi

4º Examinador Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

Araraquara, 27 de março de 2024.

DADOS CURRICULARES

Gabriel Garcia de Carvalho

NASCIMENTO	15 de Abril de 1992 – João Pessoa – PB – Brasil
FILIAÇÃO	Adriana Coeli Garcia de Carvalho Arlan Giovanni Duarte Carvalho
2010 – 2017	Graduação em Odontologia Universidade Federal da Paraíba
2017	Atualização em Cirurgia Oral Associação Brasileira de Odontologia – Secção Paraíba
2018 – 2020	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara
2019 – 2020	Especialização em Reabilitação Oral Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD Araraquara
2020 – 2023	Especialização em Periodontia Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD Araraquara
2020 – 2023	Especialização em Implantodontia Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD Araraquara
2020 – Atual	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

À professora Daniela Zandim, a Dani!, por me acompanhar durante toda minha trajetória em Araraquara, fizemos uma parceria de trabalho que nos rendeu bons frutos, sua colaboração foi fundamental durante meu crescimento profissional.

Aos professores Kleber Oliveira, Alessandra Rastelli, Carla Raquel, Marlus Chorilli, Adriana Marcantonio, Patrícia Maquera, pela orientação e disponibilidade de material e equipamento para realização deste estudo.

Aos amigos Julio, Ingra, Nicolas, Javier, Jhonatan, Mariely, Lorena, Vitor, Carol, pela amizade e companheirismo, em especial, nos momentos mais difíceis. Isabella, pela parceria, compreensão e ajuda nesta reta final.

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

À FOAr – UNESP, pelo apoio institucional.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo N° 2016/00275-8, 2018/0836-2, 2018/00106-7 e 2013/07276-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa, e bolsa de estudo disponibilizada (2020/04499-3).

Carvalho GG. Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 e LL-37 em nanoemulsão no tratamento da doença periodontal: estudo *in vitro* e *in vivo* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

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 durante o tratamento, a presença persistente de periodontopatógenos nas bolsas mais profundas e defesa imunológica deficiente. Dentre estas terapias, destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e o uso de peptídeos antimicrobianos (PAM). O objetivo geral deste estudo foi investigar a otimização de clorina-e6 (Ce6) na terapia fotodinâmica e seu efeito como terapia coadjuvante no tratamento não cirúrgico da DP. Os objetivos específicos foram: (1) testar o efeito antimicrobiano da Ce6 irradiada por luz azul ou vermelha sobre biofilme multiespécie de periodontopatógenos; (2) otimizar o Ce6 em nanoemulsão e testar o efeito sinérgico do LL-37 com aPDT sobre biofilme multiespécie de periodontopatógenos; (3) testar o efeito de aplicações múltiplas da aPDT utilizando nanoemulsão carregada com Ce6 e LL-37 no tratamento de ratos com DP induzida. Biofilme multiespécie com bactérias periodontopatogênicas foi desenvolvido em condições ideais para avaliação antimicrobiana nos estudos 1 e 2, e a mesma foi avaliada por meio de ensaio qPCR. No estudo 1, a maior eliminação bacteriana foi observada nos grupos onde a luz azul foi aplicada. No estudo 2, após otimização e caracterização da Ce6 em nanoemulsão, foi observado que a combinação Ce6 e LL-37 em nanoemulsão foi efetiva na eliminação de todas as bactérias testadas. No estudo *in vivo*, sessões únicas ou múltiplas de terapia fotodinâmica com clorina-e6 conjugada com peptídeo antimicrobiano LL-37 em nanoemulsão como adjuvante da RAR no tratamento da DP não proporcionaram benefícios em comparação à terapia convencional isoladamente.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Fármacos fotossensibilizantes. Periodontite.

Carvalho GG. Antimicrobial photodynamic therapy with the use of chlorine-e6 and LL-37 in nanoemulsion for the treatment of periodontal disease: an *in vitro* and *in vivo* study. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Scaling and root planning (SRP) is considered the first choice as the non-surgical therapy for the treatment of periodontal disease (PD). However, this therapy might present limitations and failures. Thus, alternative therapies have been investigated to overcome SRP deficiencies that may be related to limited access to the root surface, the persistent presence of periodontopathogens in deeper pockets and poor immune defense. Among these therapies, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and the use of antimicrobial peptides (AMP) stand out. The general purpose of this study was to investigate the optimization of chlorin-e6 (Ce6) in photodynamic therapy and its effect as an adjuvant therapy in the non-surgical treatment of PD. The specific objectives are: (1) to test the antimicrobial effect of Ce6 irradiated by blue or red light against multispecies biofilm of periodontopathogens; (2) to optimize the Ce6 in a nanoemulsion and test the synergistic effect of LL-37 with aPDT against multispecies biofilm of periodontopathogens; (3) to test the effect of multiple applications of aPDT using a nanoemulsion loaded with Ce6 and LL-37 in the treatment of rats with induced periodontal disease. Multispecies biofilm with periodontopathogenic bacteria was developed under ideal conditions for antimicrobial evaluation in studies 1 and 2, antimicrobial effect was evaluated using qPCR assay. In study 1, the highest bacterial elimination was observed in the groups where blue light was applied. In study 2, after optimization and characterization of Ce6 in nanoemulsion, it was observed that the combination of Ce6 and LL-37 in nanoemulsion was effective in eliminating all tested bacteria. In the *in vivo* study, single or multiple sessions of aPDT with chlorin-e6 conjugated to the antimicrobial peptide LL-37 loaded nanoemulsion as adjunct to SRP in the treatment of periodontitis provided no benefits compared to SRP alone in rats.

Keywords: Photochemotherapy. Photosensitizing agents. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3 PUBLICAÇÕES	14
3.1 Artigo 1	14
3.2 Artigo 2	32
3.3 Artigo 3.....	54
4 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A-	81
ANEXOS A.....	93
ANEXO B	94

1 INTRODUÇÃO

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

A remoção e alteração da microbiota patogênica do biofilme é imprescindível para a prevenção e controle da doença periodontal, sendo a raspagem e o alisamento radicular (RAR) a terapia não-cirúrgica de escolha para tratamento da doença e manutenção da homeostasia periodontal. Apesar dos resultados clínicos positivos obtidos com RAR³⁻⁶, esta terapia pode apresentar limitações e insucessos quando abordada isoladamente em determinados quadros clínicos. Assim, terapias alternativas têm sido investigadas em virtude do limitado acesso à superfície radicular durante a RAR⁷⁻⁹, da presença de periodontopatógenos nas bolsas mais profundas¹⁰ e da habilidade de algumas bactérias em invadir tecido adjacente¹¹. Quando se considera o tratamento, em caso de doença periodontal estágio 3, o uso de antibióticos locais ou sistêmicos é apresentado como alternativa, mas seu uso como coadjuvante pode induzir efeitos sistêmicos indesejáveis e formação de espécies bacterianas resistentes à terapia medicamentosa¹²⁻¹⁴. Além disso, a eficácia da terapia com uso de antibióticos sistêmicos depende da colaboração do paciente em seguir corretamente o protocolo medicamentoso indicado.

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

A aPDT consiste na excitação do fotossensibilizador (FS) em seu estado fundamental por uma luz no espectro visível. Com a energia absorvida, esta molécula pode sofrer transição ao estado singleto ou tripleto excitado, que poderá desencadear três reações. Na reação de tipo

I, ocorre a transferência de elétron entre o FS e oxigênio molecular, permitindo o seu retorno ao estado fundamental e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*). Na reação tipo II, o FS 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 células²⁹. Acredita-se que os processos do Tipo II preservem melhor a estrutura molecular do FS em um estado fotoativável e, em algumas circunstâncias, uma única molécula de FS pode gerar 10.000 moléculas de oxigênio singleto. Uma terceira via (Tipo III), pouco comum, ocorre na ausência de oxigênio, quando a molécula do FS interage diretamente com a biomolécula, provocando um dano celular (toxicidade no escuro) e consequente destruição do FS²⁹⁻³¹. 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 formação³².

Dentre as vantagens do emprego desta terapia, encontram-se: morte bacteriana rápida e localizada, evitando a manutenção de altas concentrações de fármacos por longo período (antibióticos e antissépticos); o fato do efeito bactericida não estar ligado à mediação de radicais químicos, reduzindo o risco à resistência bacteriana; e o acesso facilitado a regiões de difícil acesso pela terapia convencional (RAR), como bolsas profundas e bi- ou trifurcação de raízes³³.

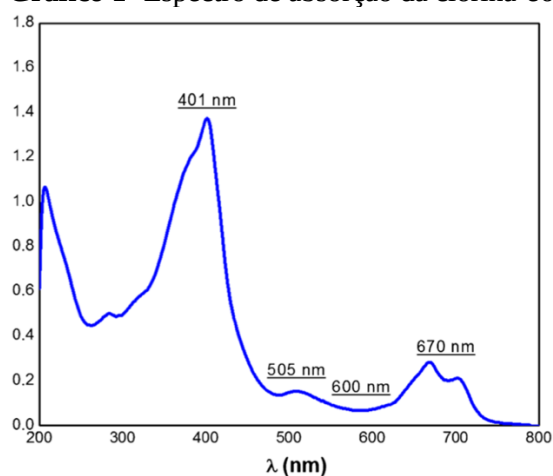
A aPDT tem sido indicada como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite estágio 3, retratamento de bolsas residuais, descontaminação para terapia cirúrgica, terapia de manutenção, dentre outros³⁴⁻³⁶. Sua indicação na terapia de manutenção tem como vantagem o menor desgaste da superfície radicular, que seria um aspecto negativo da utilização da técnica convencional (RAR) e neste caso, a aPDT seria utilizada isoladamente, reduzindo a incidência de hipersensibilidade causada pela remoção de cimento inerente às múltiplas sessões de RAR³⁷.

A clorina e6 (Ce6) surgiu em meados dos anos 90 como um FS de segunda geração bastante promissor em terapias oncológicas³⁸. A clorina e seus derivados estão sendo utilizados em diversos tratamentos com utilização de luz, como cânceres^{39,40}, leucoplasias⁴¹, infecções endodônticas⁴², e contra biofilmes formados por *Streptococcus mutans*⁴³. Trata-se de um composto natural extraído da clorofila. Algumas formulações a base de clorina estão disponíveis no mercado para tratamento antibacteriano, antienvelhecimento e antineoplásico, como Revixan® e Photolon®. Este FS também demonstrou atividade antimicrobiana, in vitro, quando utilizado sobre bactérias presentes na doença periodontal na forma planctônica, apresentando redução das unidades formadoras de colônia⁴⁴⁻⁴⁶.

Fotossensibilizadores a base de clorina apresentam dois picos de absorção de luz, nas

luzes vermelha e azul (**Gráfico 1**). Tradicionalmente, a luz vermelha é preferida por se acreditar em sua maior capacidade de penetração nos tecidos. Porém, comprimentos de onda em torno de 412 nm (azul) apresentaram 30-33% maior coeficiente de absorção de energia e efeito bactericida que comprimentos de onda equivalentes a luz visível vermelha⁴⁷. Estes resultados demonstram que fotossensibilizadores excitados em comprimentos de onda na luz visível azul podem ser preferidos em terapias que visem tratar superfícies, como é o caso dos protocolos antimicrobianos sobre biofilmes. O estudo de Shakhova e colaboradores⁴⁸ avaliou a ativação deste FS nos dois comprimentos de onda, 405 nm (luz azul) e 660 nm (luz vermelha); para a pele, os valores de saturação foram de aproximadamente 0,2 J/mm² para ambos os comprimentos de onda, indicando que cerca de 40% do incidente da energia é absorvida dentro do tecido; 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 de 4 mm.

Gráfico 1- Espectro de absorção da clorina-e6



Fonte: Elaboração própria.

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

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa testou, de maneira pioneira, a utilização da Ce6 ativada por luz azul contra biofilme periodontopatogênico monoespécie, obtendo

resultados de eliminação microbiana de até 3 log₁₀, para *Streptococcus oralis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*⁴⁹.

Para biofilmes multiespécies, acredita-se que a aplicação tradicional da aPDT pode não produzir efeitos antimicrobianos significativos, uma vez que os mecanismos de defesa aprimorados nestes casos, tornam sua erradicação dificultada. Desta forma, as nanopartículas^{50,51} e nanoemulsões⁵² surgem como uma estratégia que podem superar limitações no emprego de fotossensibilizadores na aPDT.

Peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes indispensáveis da resposta imune inata de animais e plantas e são considerados a primeira linha de defesa contra patógenos⁵³. Os PAMs interagem com a membrana celular de bactérias por meio de interações eletrostáticas, sofrem adsorção e alteração conformacional, promovendo danos de membrana⁵⁴. Um possível efeito sinérgico da aplicação de aPDT + PAM, poderia ser explicado pela maior internalização das moléculas do FS a partir dos danos de membrana produzidos pela ação do PAM, ou mesmo, aumento da suscetibilidade da bactéria afetada pelo PAM à presença de espécies reativas dispersas na região (produzidas pela aPDT)^{55,56}.

De maneira geral, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da aPDT com utilização da clorina como fotossensibilizador contra patógenos orais⁵⁷⁻⁶⁴. Estudos pregressos, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram que a Ce6 é um FS promissor no tratamento da doença periodontal, e a formulação deste em nanoemulsão pode garantir maior estabilidade, substantividade e solubilidade. Ainda, investigar um possível efeito sinérgico deste FS conjugado ao PAM, pode representar efeito biológico clinicamente expressivo. No presente estudo foi testado o extrato puro da Ce6, composto ainda não patenteado, desenvolvido pelo Laboratório de Química Bio-orgânica, UFSCar – São Carlos. Assim, o presente estudo investigou a otimização de Ce6 na terapia fotodinâmica e sua contribuição na resolubilidade da doença periodontal.

4 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da clorina-e6 apresentou efeito antimicrobiano significativo quando irradiada por luz azul ou vermelha sobre biofilme periodontopatogênico, com redução mais evidente nos grupos tratados com luz azul para *S. oralis*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. O efeito antimicrobiano mais expressivo foi observado quando a terapia fotodinâmica ocorreu na presença de Ce6 + LL-37 em nanoemulsão. Em estudo *in vivo*, sessões únicas ou múltiplas de terapia fotodinâmica com clorina-e6 conjugada com peptídeo antimicrobiano LL-37 em nanoemulsão como adjuvante da raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite não proporcionaram benefícios em comparação à terapia convencional isoladamente.

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

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

14. Winkelhoff AJ, Herrera GD, Winkel EG, Delleemijn-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.
15. 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.
16. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD. Recent patents on light based therapy: photodynamic therapy, photothermal therapy and photodynamic immunotherapy. *Recent Pat Endocr, Metab Immune Drug Disc*. 2014; 8(1): 1 -8.
17. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005; 76(7): 1100 -5.
18. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(3): 219 -28.
19. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010; 81(7): 975 -81.
20. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, 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.
21. 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.
22. Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non- surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2012; 44(4): 296-302.
23. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, Bosco AF et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(1): 143-50
24. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casati CA et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013; 84(4): 556 -65.
25. Garcia VG, Longo M, Gualberto Junior EC, Bosco AF, Nagata MJH, 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 Periodontal Res*. 2014; 49(5): 584 -94.

26. Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(6): 1647-56.
27. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, 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 -ZC12.
28. 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.
29. Martinez de Pinillos Bayona A, Mroz P, Thunshelle C, Hamblin MR. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 89(2): 192-206.
30. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4): 250 -81.
31. 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.
32. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells that can be used to estimate the lifetime of single oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991; 53(4): 549-53.
33. Fontana CR. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies [tese de doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.
34. Lulic M, Leiggener Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP et al. One-year outcomees of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized- controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(8): 661-6.
35. Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH Jr et al. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2014; 85(8): 277 -86.
36. Müller Campanile VS, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombelli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lases Med Sci.* 2015; 30: 27 -34.
37. Theodoro LH, Garcia VG. Uso do laser e suas implicações como alternativa terapêutica na Periodontia e Implantodontia. IN: Silva EB, Grisi DC. Periodontia no contexto interdisciplinas integrando as melhores práticas. Nova Odessa: Napoleão; 2015.

38. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009; 6(2): 94 -6.
39. 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 J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2015; 36(9): 6839 -47.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Drulis-Kawa Z, Bednarkiewicz A, Bugla-Płaskonska G, Strek W, Doroszkiewicz W. The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inactivation with Fotolon (chlorin e6). *Pol J Microbiol.* 2005; 54(4): 305 -10.
45. 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.
46. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10): 2595 -601.
47. Huang L, Wand M, Huand YY, El-Hussei A, Wolf LM, Chiang LY et al. Progressive cationic functionalization of chlorin derivates for antimicrobial photodynamic inactivation and related vancomycin conjugates. *Photochem Photobiol Sci.* 2018; 17(5): 638 -51.
48. 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.
49. Carvalho GG, Sanchez-Puetate JC, Donatoni MC, Huacho PMM, Rastelli ANS, de 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.
50. Freitas LM, Calixto GM, Chorilli M, Giusti JS, Bagnato VS, Soukos NS et al. Polymeric nanoparticle-based photodynamic therapy for chronic periodontitis in vivo. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(5): 769.

51. Oshiro-Junior JA, Sato MR, Boni FI, Santos KLM, de Oliveira KT, de Freitas LM et al. Phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid for photodynamic therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 108: 110462.
52. da Silva PB, de Freitas ES, Solcia MC, de Souza PC, da Silva MM, Batista AA et al. A nanostructured lipid system to improve the oral bioavailability of ruthenium (ii) complexes for the treatment of infections caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2930.
53. Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jozwik A, Horbańczuk J et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 10957-70.
54. Som A, Vemparala S, Ivanov I, Tew GN. Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2008; 90: 83 -93.
55. de Freitas LM, Lorenzón EN, Cilli EM, de Oliveira KT, Fontana CR, Mang TS. Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation. *Biofouling*. 2019; 35(7): 742 -57.
56. de Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LHP, Uliana MP, de Oliveira KT et al. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4212.
57. Drulis-Kawa Z, Bednarkiewicz A, Bugla-Płoskonska G, Strek W, Doroszkiewicz W. The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inactivation with Fotolon (chlorin e6). *Pol J Microbiol*. 2005; 54(4): 305 -10.
58. 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.
59. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(10): 2595-601.
60. 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.
61. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6(7): 979-86.
62. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Growth rate and the resistance of Gram-negative biofilms to cetrимide. *J Antimicrob Chemother*. 1990; 26(4): 473 -8.
63. Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Med Mycol*. 2019; 57(5): 609 -17.

64. Tavares LJ, de Avila ED, Klein MI, Panariello BHD, Spolidório DMP, Pavarina AC. 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.