

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/03/2022.



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



Julio Cesar Sánchez Puetate

**Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica
antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e
in vitro**

Araraquara

2020



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



Julio Cesar Sánchez Puetate

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Coorientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

Araraquara

2020

Sánchez Puetate, Julio Cesar

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro / Julio Cesar Sánchez Puetate.-- Araraquara: [s.n.], 2020

64f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Coorientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

1. Fotoquimioterapia 2. Biofilmes 3. Periodontite

I.Título

Julio Cesar Sánchez Puetate

Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador: Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro

3º Examinador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Araraquara, 30 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Julio Cesar Sánchez Puetate

NASCIMENTO	02 de Maio de 1990 – Quito – Equador
FILIAÇÃO	Rosa de las Nieves Puetate Llerena Julio César Sánchez Zambrano
2008-2013	Graduação em Odontologia Universidad Central del Ecuador - Equador
2015-2017	Especialização em Periodontia Universidad San Francisco de Quito - Equador
2017-2019	Especialização em Implantodontia Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia Faculdade Herrero
2018-Atual	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Aos meus Pais,
que iluminam meu caminho com o coração cheio de amor e paciência, pela
compreensão, por aceitarem e apoiarem a minha escolha neste caminho, as
palavras não são suficientes para descrever todo o amor que sinto por vocês, muito
obrigado por sonhar comigo.

Aos meus irmãos,
pelo suporte incondicional mesmo com a distância e as saudades, vocês sempre
serão parte das minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos,
que me inspiram com o brilho de suas miradas e a ingenuidade de seus sorrisos,
vocês são a minha grande inspiração.

Ao meu avô.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, pela confiança para a realização desta pesquisa, pela motivação e por sua valiosa orientação, por suas contribuições científicas e humanas para me formar plenamente durante esse período.

À Profa. Denise Madalena Palomari Spolidorio, pela solicitude e pela oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório de Microbiologia, por guiar os passos nesse novo desafio que foi trabalhar num laboratório.

À Profa. Janice Rodrigues Perussi e ao Prof. Anderson Ribeiro de Oliveira, pela síntese dos fotossensibilizadores, para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Alessandra Rastelli, pelo empréstimo do equipamento para o desenvolvimento da parte do projeto.

À Patty Maquera Huacho, por toda a paciência, e pelos ensinamentos transmitidos, fico muito grato por ter tido a oportunidade de compartilhar essa fase da minha formação acadêmica ficando perto de você, obrigado pela compreensão das minhas limitações durante este período.

Ao Gabriel e José Rodolfo, companheiros e grandes amigos, por seus valiosos conselhos e tornar esta etapa acadêmica mais suportável, com todas as experiências e memórias.

À Beatriz Aroni, pela ajuda com parte do desenvolvimento deste trabalho, tendo sempre interesse em crescermos juntos.

Aos meus amigos David, Luis e Javier amizade de longa data e irmãos que a vida me deu, apesar da distância, minha gratidão pelo apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos e Vice-Diretora, Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, pela oportunidade e infra-estrutura oferecidas para à realização deste projeto.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, José Alexandre e Cristiano, pela sua atenção.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/00275-8) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles
são a abertura para achar as que estão certas.
Carl Sagan*

* Sagan C. Pálido ponto azul. Rio de Janeiro: Companhia das Letras; 2019.

Sánchez-Puetate JC. Avaliação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida: estudo in vivo e in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT), tem sido utilizada como uma terapia coadjuvante na doença periodontal (DP). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos da aPDT, com os fotossensibilizadores Hipericina-glucamina (Hy-g) e Ftalocianina-glucamina (Ft-g), no tratamento e progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos, assim como sobre um modelo de biofilme multiespécie in vitro. Os micro-organismos avaliados foram *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, JP2), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*, ATCC25586), e *Streptococcus oralis* (*S. oralis*, ATCC 35037). Dois estudos distintos foram conduzidos. No Estudo 1, foi avaliado in vivo a viabilidade dos micro-organismos mediante o modelo da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos após 7 dias de indução da DP. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais (n=8): Grupo Controle; Ftalocianina-glucamina (Ft-g); Hipericina-glucamina (Hy-g); LED vermelho (LV, 655nm; 34 J/cm²); LED âmbar (LA, 590nm; 34,10 J/cm²); aPDT 1 (aPDT-Hy-g + LA); aPDT 2 (aPDT-Ft-g + LV). Os animais foram eutanasiados com 7 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos no período baseline. No Estudo 2, foi avaliado in vitro a viabilidade dos micro-organismos mediante o modelo de biofilme multiespécie, as amostras foram divididas em 8 grupos experimentais: Controle Negativo; Controle Positivo (clorexidina 0,12%); Ftalocianina-glucamina (Ft-g); Hipericina-glucamina (Hy-g); LED Vermelho (LED-V, 660nm; 39,65 J/cm²); LED Âmbar (LED-A, 590nm; 39,30 J/cm²); aPDT 1 (aPDT-Ft-g + LV); aPDT 2 (aPDT-Hy-g + LA), três experimentos independentes foram realizados em triplicata (n=9). Para os dois estudos foi analisada a quantificação individual dos micro-organismos pela técnica de qPCR combinada com Propidium Monoazide (PMA). Os dados foram submetidos a análise estatística ($\alpha=0,05$). Os resultados do modelo in vivo no período baseline quando comparados os grupos aPDTs com o grupo controle negativo para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,89 \pm 0,11$), aPDT 1 ($6,74 \pm 0,26$), aPDT 2 ($5,88 \pm 0,42$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($9,98 \pm 0,20$), aPDT 1 ($9,76 \pm 0,42$), aPDT 2 ($9,10 \pm 0,43^*$); para *A. actinomycetemcomitans* foram, no grupo controle ($9,75 \pm 0,54$), aPDT 1 ($10,25 \pm 0,47^*$), aPDT 2 ($9,57 \pm 0,14$); para *So* foram, no grupo controle ($2,62 \pm 0,30$), aPDT 1 ($2,28 \pm 0,30^*$), aPDT 2 ($2,12 \pm 0,14^*$); no período de 7 dias para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,08 \pm 0,39$), aPDT 1 ($7,13 \pm 0,18^*$), aPDT 2 ($6,73 \pm 0,35$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($8,39 \pm 0,27$), aPDT 1 ($9,45 \pm 0,29^*$), aPDT 2 ($9,42 \pm 0,11^*$); para *A. actinomycetemcomitans* foram, no grupo controle ($8,75 \pm 0,30$), aPDT 1 ($8,36 \pm 0,27$), aPDT 2 ($8,44 \pm 0,44$); para *So* foram, no grupo controle ($2,55 \pm 0,26$), aPDT 1 ($2,66 \pm 0,20$), aPDT 2 ($2,75 \pm 0,28$); no período de 30 dias para *P. gingivalis* foram, no grupo controle ($6,98 \pm 0,31$), aPDT 1 ($6,95 \pm 0,39$), aPDT 2 ($6,67 \pm 0,38$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle ($9,18 \pm 0,59$), aPDT 1 ($9,41 \pm 0,42$), aPDT 2

($9,26 \pm 0,33$); para *A. actynomicetemcomitans* foram, no grupo controle ($8,75 \pm 0,34$), aPDT 1 ($8,39 \pm 0,35^*$), aPDT 2 ($7,80 \pm 0,75^*$); para *S. oralis* foram, no grupo controle ($2,62 \pm 0,35$), aPDT 1 ($2,93 \pm 0,44$), aPDT 2 ($2,98 \pm 0,26$). Os resultados do modelo in vitro quando comparados os grupos aPDTs com o grupo controle negativo para *A. actynomicetemcomitans* foram, no grupo controle negativo ($8,77 \pm 0,93$), aPDT 1 ($6,74 \pm 0,74^*$), aPDT 2 ($9,05 \pm 0,70$); para *F. nucleatum* foram, no grupo controle negativo ($8,99 \pm 0,84$), aPDT 1 ($7,42 \pm 0,52^*$), aPDT 2 ($12,24 \pm 0,42^*$); para *P. gingivalis* foram, no grupo controle negativo ($6,60 \pm 0,33$), aPDT 1 ($5,77 \pm 0,58^*$), aPDT 2 ($7,63 \pm 0,23$); para *S. oralis* foram, no grupo controle negativo ($8,81 \pm 0,49$), aPDT 1 ($8,34 \pm 0,65$), aPDT 2 ($9,78 \pm 0,20$).

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Biofilmes. Periodontite.

Sánchez-Puetate JC. Evaluation of different photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of induced periodontal disease: in vivo and in vitro study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (antimicrobial Photodynamic Therapy - aPDT), has been used as an adjunct therapy in periodontal disease (PD). The objective of this work was to evaluate the antimicrobial effects of aPDT, with the photosensitizers Hypericin-glucamine (Hy-g) and Phthalocyanine-glucamine (Ft-g), in the treatment and progression of experimentally induced periodontal disease in rats, as well as on a model of multispecies biofilm in vitro. The microorganisms evaluated were *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, ATCC 33277), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*, JP2), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*, ATCC25586), e *Streptococcus oralis* (*S. oralis*, ATCC 35037). Two separate studies were conducted. In Study 1, the viability of microorganisms was evaluated in vivo using the periodontal disease model experimentally induced in rats after 7 days of PD induction. The animals were divided into 7 experimental groups (n = 8): Control Group; Phthalocyanine-glucamine (Ft-g); Hypericin-glucamine (Hy-g); Red LED (LV, 655nm; 34 J / cm²); Amber LED (LA, 590nm; 34.10 J / cm²); aPDT 1 (aPDT-Hy-g + LA); aPDT 2 (aPDT-Ft-g + LV). The animals were euthanized 7 and 30 days after the application of the treatments in the baseline period. In Study 2, the viability of microorganisms was evaluated in vitro using the multispecies biofilm model, the samples were divided into 8 experimental groups: Negative Control; Positive Control (0.12% chlorhexidine); Phthalocyanine-glucamine (Ft-g); Hypericin-glucamine (Hy-g); Red LED (LED-V, 660nm; 39.65 J / cm²); Amber LED (LED-A, 590nm; 39.30 J / cm²); aPDT 1 (aPDT-Ft-g + LV); aPDT 2 (aPDT-Hy-g + LA), three independent experiments were carried out in triplicate (n = 9). For both studies, the individual quantification of microorganisms was analyzed using the qPCR technique combined with Propidium Monoazide (PMA). The data were submitted to statistical analysis ($\alpha = 0.05$). The results of the in vivo model in the baseline period when comparing the aPDTs groups with the *P. gingivalis* negative control group were, in the control group (6.89 ± 0.11), aPDT 1 (6.74 ± 0.26), aPDT 2 (5.88 ± 0.42); for *F. nucleatum*, in the control group (9.98 ± 0.20), aPDT 1 (9.76 ± 0.42), aPDT 2 (9.10 ± 0.43 *); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (9.75 ± 0.54), aPDT 1 (10.25 ± 0.47 *), aPDT 2 (9.57 ± 0.14); for *S. oralis*, in the control group (2.62 ± 0.30), aPDT 1 (2.28 ± 0.30 *), aPDT 2 (2.12 ± 0.14 *); in the 7-day period for *P. gingivalis*, in the control group (6.08 ± 0.39), aPDT 1 (7.13 ± 0.18 *), aPDT 2 (6.73 ± 0.35); for *F. nucleatum*, in the control group (8.39 ± 0.27), aPDT 1 (9.45 ± 0.29 *), aPDT 2 (9.42 ± 0.11 *); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (8.75 ± 0.30), aPDT 1 (8.36 ± 0.27), aPDT 2 (8.44 ± 0.44); for *S. oralis*, in the control group (2.55 ± 0.26), aPDT 1 (2.66 ± 0.20), aPDT 2 (2.75 ± 0.28); in the 30-day period for *P. gingivalis*, in the control group (6.98 ± 0.31), aPDT 1 (6.95 ± 0.39), aPDT 2 (6.67 ± 0.38); for *F. nucleatum*, in the control group (9.18 ± 0.59), aPDT 1 (9.41 ± 0.42), aPDT 2 (9.26 ± 0.33); for *A. actinomycetemcomitans*, in the control group (8.75 ± 0.34), aPDT 1 (8.39 ± 0.35 *), aPDT 2 (7.80 ± 0.75 *); for *S. oralis*, in the control group (2.62 ± 0.35), aPDT 1 (2.93 ± 0.44), aPDT 2 (2.98 ± 0.26). The results of the in vitro model when comparing the aPDTs groups with the negative

control group for *A. actynomicetemcomitans* were, in the negative control group (8.77 ± 0.93), aPDT 1 (6.74 ± 0.74 *), aPDT 2 (9.05 ± 0.70); for *F. nucleatum*, in the negative control group (8.99 ± 0.84), aPDT 1 (7.42 ± 0.52 *), aPDT 2 (12.24 ± 0.42 *); for *P. gingivalis*, in the negative control group (6.60 ± 0.33), aPDT 1 (5.77 ± 0.58 *), aPDT 2 (7.63 ± 0.23); for *S. oralis*, in the negative control group (8.81 ± 0.49), aPDT 1 (8.34 ± 0.65), aPDT 2 (9.78 ± 0.20).

Keywords: Photochemotherapy. Biofilms. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Estudo In Vivo.....	26
4.2 Estudo In Vitro	32
4.3 Análise Estatística Modelo Biofilme In Vivo	37
4.4 Análise Estatística Modelo Biofilme Multiespécie In Vitro	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Efeitos Da aPDT No Modelo Biofilme In Vivo	39
5.2 Efeitos Da aPDT No Modelo De Biofilme Multiespécie In Vitro.....	42
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	62
APÊNDICE A –RESULTADOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

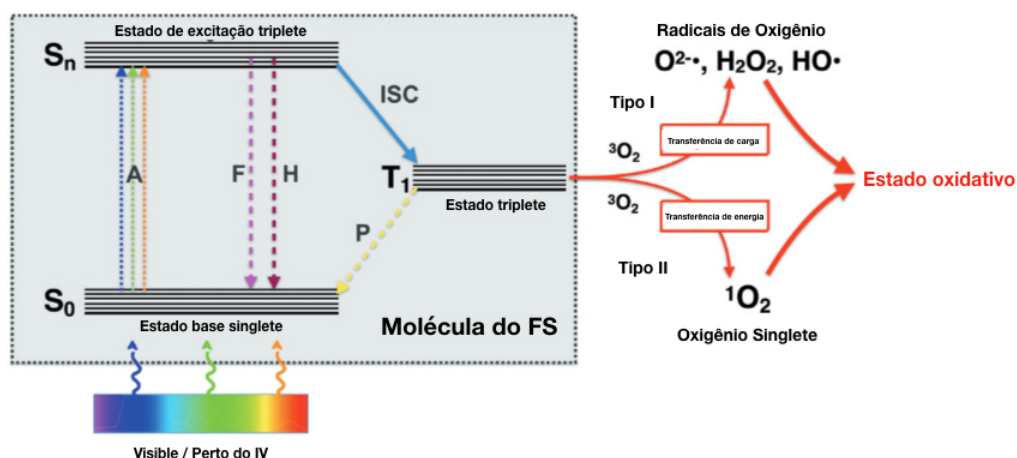
O entendimento da patogênese das doenças e condições periodontais está continuamente mudando com o aumento do conhecimento científico. A Periodontite é definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por grupos de micro-organismos específicos, sítio-específica e caracterizada por sinais clínicos como inflamação, sangramento à sondagem e perda de inserção^{1,2}.

A terapia periodontal visa reduzir a carga microbiana, mediante remoção mecânica do biofilme para impedir ou retardar a progressão da doença periodontal³ e atualmente o tratamento mais usado é a remoção e desorganização do biofilme, sendo a Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) a terapia não-cirúrgica de escolha. Os resultados clínicos obtidos com RAR são, em geral, satisfatórios⁴⁻⁶. No entanto, esta terapia pode apresentar limitações em determinados quadros clínicos, assim, novas terapias têm surgido como alternativas terapêuticas^{7,8}.

Sabendo da crescente resistência de algumas cepas bacterianas pelo uso de antibióticos e do interesse em buscar estratégias terapêuticas que apresentem pouco ou nenhum efeito colateral, nos últimos anos, vêm sendo utilizadas terapias com fontes de luzes (Lasers e LEDs) para o tratamento das doenças periodontais⁸. Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – Photodynamic Antimicrobial Therapy) tem relevância por ser um procedimento coadjuvante pela sua ação antimicrobiana e pela pouca invasividade. Vários estudos têm comprovado a eficácia da aPDT, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*⁹⁻¹⁵, porém ainda não existe consenso para benefícios da aPDT.

A aPDT como mostrado na Figura 1, consiste na utilização de um fotossensibilizador (FS) associado a uma fonte de luz (LASER/LED), capaz de excitar o FS formando radicais livres e espécies altamente reativas de oxigênio, que subsequentemente produzem a morte bacteriana e destruição dos seus subprodutos^{14,16}. A aPDT apresenta segurança na sua utilização, devido aos seus produtos e subprodutos não serem citotóxicos com células não alvo (aonde o FS não teve permeabilidade)¹⁷.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski



Fonte: Adaptado de Cieplik et al.¹⁸ 2018 para o português.

Estudos tem demonstrado que a aPDT é uma terapia coadjuvante no tratamento da periodontite crônica, retratamento de bolsas residuais, coadjuvante na terapia cirúrgica, terapia de manutenção, dentre outros^{19–21}. Sua indicação na terapia de manutenção tem como vantagem o menor desgaste da superfície radicular, neste caso reduzindo a incidência da hipersensibilidade dentinária causada pela remoção excessiva do cimento radicular nas sessões de manutenção de RAR²².

Os estudos do grupo de pesquisa de Garcia et al.¹² e Theodoro et al.²² que avaliaram a utilização da terapia fotodinâmica em associação a raspagem e alisamento radicular, em vários modelos, concluíram que a aplicação de aPDT como tratamento adjunto à RAR reduziu significativamente os níveis de *A. actinomycetemcomitans*, além de observarem menor perda óssea em área de furca quando realizada apenas uma aplicação da aPDT.

Vários FS estão mencionados na literatura, sendo as fenotiazinas como o azul de metileno e azul de toluidina os mais citados, porém estes estudos não têm demonstrado vantagens clínicas no tratamento periodontal^{23,24}, indicando, desta forma, a necessidade de novos estudos com objetivo de testar novos FS.

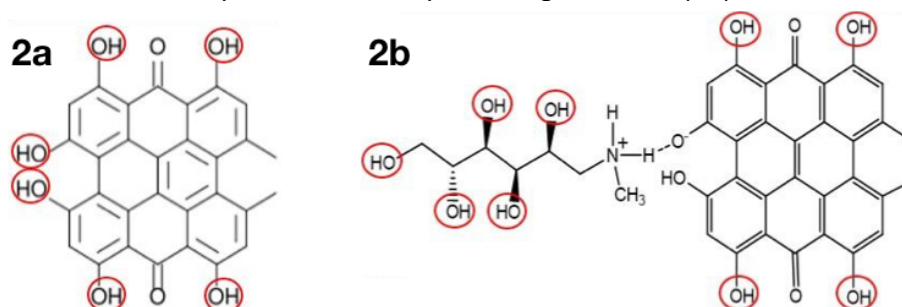
A literatura mostra que as bactérias Gram-positivas (G+) podem ser eliminadas por diversos FS e doses mais baixas de irradiação do que bactérias

Gram-negativas (G-)^{25,26}. Os parâmetros importantes do FS para esta interação bacteriana incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, capacidade de ionização, fatores específicos como as características de absorção de luz, e a eficiência da formação do estado excitado tripleto ou da produção de oxigênio singleto²⁶⁻²⁸.

Portanto, para uma maior eficiência da inativação dos micro-organismos, essas diferenças devem ser superadas modificando o FS quanto a sua hidrofobicidade e carga, de acordo com a característica celular de cada micro-organismo²⁶. A importância da hidrofobicidade baseia-se que em meio aquoso leva à autoagregação e, em muitos casos, a uma subsequente precipitação, reduzindo drasticamente a capacidade do composto de gerar espécies reativas de oxigênio, desse modo, é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solúvel em meio aquoso para possível aplicação clínica.

A Hipericina (Figura 2) é um FS natural, presente em plantas herbáceas conhecidas como erva de São João (gênero *Hypericum perforatum*)²⁹. Possui propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas²⁹⁻³³. É considerada uma quinona policíclica (Figura 2a) que, quando ativada, reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio, induzindo a produção do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), além de ser potente e fotoestável^{32,34,35}.

Figura 2 - Estrutura química da Hipericina: estrutura base da Hipericina (2a), e sua espécie supramolecular Hipericina-glucamina (2b)



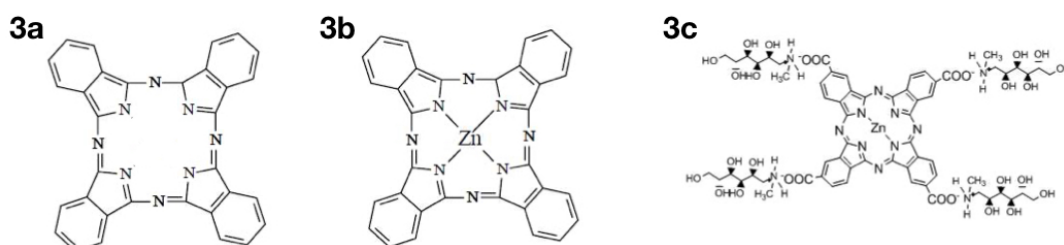
Fonte: Macedo et al.³⁶

O FS Hipericina possui característica hidrofóbica e, perde a sua ação quando em meio biológico. Uma estratégia proposta para melhorar o comportamento químico é a indução da formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Uma supramolécula é uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas, unidas por interações moleculares, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade³⁷. No caso da Hipericina, para a formação de uma supramolécula hidrofílica, é induzida uma reação a partir do grupo fenólico, que cede o próton H⁺, formando a Hipericina-glucamina (Figura 2b).

A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula Hipericina-glucamina, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio serão estabelecidas, aumentando sua hidrofiliidade. Em estudos prévios *in vitro*, foram avaliadas diferentes concentrações do FS Hipericina. Os resultados mostraram que a concentração de 10 mg/mL foi capaz de eliminar bactérias G⁺ e G⁻²⁶.

As Ftalocianinas (Figura 3), que são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas³⁸ têm sido estudadas e avaliadas suas aplicações³⁹⁻⁴¹. A Ftalocianina é um macrociclo simétrico composto por quatro unidades iminoisoindol com uma cavidade central de tamanho suficiente para acomodar vários íons metálicos e este metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora^{38,42}. Entre as Ftalocianinas, a Ftalocianina de cloro-alumínio tem sido sugerida por possuir propriedades fotofísicas favoráveis para uso em aPDT, uma vez que produz altas quantidades de oxigênio singlete⁴⁰. A eficácia desse FS associado à luz LED foi comprovada em um estudo *in vitro* que avaliou o potencial fotodinâmico da Ftalocianina de cloro-alumínio diluída em nanoemulsão catiônica para inativar as culturas planctônicas e de biofilmes formados por *Candida albicans*⁴¹. Outros estudos⁴³⁻⁴⁷ têm corroborado a eficiência das Ftalocianinas como agentes fotossensíveis na eliminação de micro-organismos periodonto patogênicos com uso em aPDT.

Figura 3 - Estrutura química da Ftalocianina: Estrutura base da Ftalocianina (3a), Ftalocianina acomodando o íon metálico zinco (3b), e a sua espécie supramolecular Ftalocianina-glucamina (3c)



Fonte: de Melo et al.⁴⁸

Portanto, observa-se que a utilização da aPDT demonstrou efeito antimicrobiano contra vários periodonto patogênicos^{49,50}, além de ser capaz de reduzir fatores-chave de virulência como lipopolisacarídeos e proteases^{49,51,52}, e inativar citocinas inflamatórias do hospedeiro, tais como interleucina 1 β e TNF α ⁵¹.

Conhecendo as propriedades dos FS Hipericina-glucamina e Ftalocianina-glucamina, os objetivos deste estudo foram avaliar in vivo (modelo de doença periodontal induzida em ratos) a viabilidade das bactérias periodonto patogênicas presentes nas ligaduras dos animais após o tratamento com aPDT nos diferentes períodos, utilizando a técnica de qPCR (PCR quantitativo em tempo real) em combinação com Propidium Monoazide (PMA), e in vitro, avaliar a viabilidade das bactérias periodonto patogênicas (modelo de biofilme multiespécie) após o tratamento com aPDT, utilizando a técnica de qPCR (PCR quantitativo em tempo real) em combinação com PMA.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias utilizadas e dentro das limitações dos estudos, podemos concluir:

1. A aPDT apresenta reduções na viabilidade das cepas que foram utilizadas nos diferentes modelos.
2. Embora os fotossensibilizadores utilizados, tenham sido modificados para melhorar o comportamento nos modelos estudados, ainda é limitada a sua ação contra micro-organismos anaeróbios e G- em forma de biofilmes.
3. Mais estudos in vitro e in vivo são necessários para elucidar a ação da aPDT e o efeito destes fotossensibilizadores como terapia coadjuvante no tratamento da Doença Periodontal.

REFERÊNCIAS*

1. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2010;81(1):4-14. doi:10.1902/jop.2009.090285
2. Wolff L, Dahlén G, Aeppli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol.* 1994;65(5 Suppl):498-510. doi:10.1902/jop.1994.65.5s.498
3. Grzech-Leśniak K, Gaspirc B, Sculean A. Clinical and microbiological effects of multiple applications of antibacterial photodynamic therapy in periodontal maintenance patients. A randomized controlled clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:44-50. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.05.028
4. 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):681-688. doi:10.1007/s10103-008-0565-z
5. Rajendra Santosh AB, Ogle OE, Williams D, Woodbine EF. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. *Dent Clin North Am.* 2017;61(2):217-233. doi:10.1016/j.cden.2016.11.003
6. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc.* 2015;146(7):508-24.e5. doi:10.1016/j.adaj.2015.01.028
7. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2004;36:59-97. doi:10.1111/j.1600-0757.2004.03679.x
8. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol* 2000. 2009;51:109-140. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x
9. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins, TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009;36(3):219-228. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x
10. 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):1106-1114. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01785.x

* 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>

11. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 143-150. doi: 10.1007/s10103-012-1099-y.
12. 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. doi: 10.1902/jop.2012.120163.
13. 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. doi: 10.1007/s10103-014-1632-2.
14. 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. doi: 10.1902/jop.2010.090246.
15. 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. doi: 10.1007/s10103-011-0942-x.
16. 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. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175-91. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
17. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(3):253-9.
18. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571-589. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
19. 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. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):27-34. doi: 10.1007/s10103-013-1337-y.
20. 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):e277-86. doi: 10.1902/jop.2014.130559.
21. Lulic M, Leiggenger Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):661-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.

22. Alberton Nuernberg MA, Janjacomio Miessi DM, Ivanaga CA, Bocalon Olivo M, Ervolino E, Gouveia Garcia V, et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing on alveolar bone loss: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:354-363. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.020.
23. 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. doi: 10.1111/j.1600-051x.2009.01412.x.
24. 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):1222-9. doi: 10.1902/jop.2014.130464.
25. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6(3-4):170-88. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
26. de Melo WC, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(7):669-93. doi: 10.1586/14787210.2013.811861.
27. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009;95(2):71-80. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.005.
28. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;294(2):133-40. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01555.x.
29. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev.* 2004;10(3):203-18. doi: 10.1111/j.1527-3458.2004.tb00022.x.
30. Malkin, J, Mazur Y. Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water. *Photochem Photobiol.* 1993; 57(1): 929-933. doi:10.1111/j.1751-1097.1993.tb02951.x
31. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(6):955-89. doi: 10.1111/1574-6976.12026.
32. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(6):955-89. doi: 10.1111/1574-6976.12026.
33. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):626-32. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x

34. Bernal C, Tominaga TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(2): 190. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.226.
35. Bernal C, Tominaga TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(2): 190. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.226.
36. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira GJPL, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:43-49. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.003.
37. Cassimiro DL, Kobelnik M, Ribeiro CA, Crespi MS, Boralle N. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin–meglumine supramolecular adducts. *Thermochim Acta.* 2012; 529: 59–67. doi: 10.1016/j.tca.2011.11.030.
38. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986;43(6):691-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb05648.x.
39. Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fátima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(3):575-84. doi: 10.1007/s10103-011-0962-6.
40. Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(2):273-84. doi: 10.1590/s0100-879x2004000200016.
41. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva Jde F, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol.* 2013;89(1):111-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01198.x.
42. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 859–870.
43. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992;37(11):883-7. doi: 10.1016/0003-9969(92)90058-g.
44. Oliveira DM, Lacava ZG, Lima EC, Morais PC, Tedesco AC. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6(8):2432-7. doi: 10.1166/jnn.2006.512.

45. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004;23(2):131-8. doi: 10.1016/j.ejps.2004.06.004.
46. Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 1993;16 Suppl 4:S414-5. doi: 10.1093/clinids/16.supplement_4.s414
47. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med.* 1995;16(3):272-6. doi: 10.1002/lsm.1900160309.
48. Melo WCMA. Fotoinativação seletiva dos microorganismos: *Escherichia coli* e *staphylococcus aureus*. [tese de doutorado]. São Carlos: Bioengenharia, Universidade de São Paulo; 2014.
49. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-81. doi: 10.1002/lsm.20361.
50. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004;75(10):1343-9. doi: 10.1902/jop.2004.75.10.1343.
51. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009;80(11):1790-8. doi: 10.1902/jop.2009.090214.
52. 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. doi: 10.1902/jop.2005.76.7.1100.
53. Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, Tillberg A, Jönsson B. Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *J Periodontol.* 2017;88(10):1012-1022. doi: 10.1902/jop.2017.170164.
54. Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(4):256-66. doi: 10.1590/s1678-77572004000400002.
55. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225.
56. Hajishengallis G, Abe T, Maekawa T, Hajishengallis E, Lambris JD. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Semin Immunol.* 2013;25(1):65-72. doi: 10.1016/j.smim.2013.04.004.
57. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017;10(4):369-378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
58. World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva. WHO Library. 2014

59. Wainwright M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation?. *Photochem Photobiol Sci*. 2019;18(1):12-14. doi: 10.1039/c8pp00390d.
60. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec*. 2017;17(8):775-802. doi: 10.1002/tcr.201600121.
61. Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev*. 2010;39(8):3181-209. doi: 10.1039/b926014p.
62. Zhang R, Li Y, Zhou M, Wang C, Feng P, Miao W, et al. Photodynamic Chitosan Nano-Assembly as a Potent Alternative Candidate for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(30):26711-26721. doi: 10.1021/acsami.9b09020.
63. Kessel D. Photodynamic Therapy: A Brief History. *J Clin Med*. 2019; 8(10):1581. doi: 10.3390/jcm8101581.
64. de 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. doi: 10.3390/ijms17050769.
65. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992; 55(1):145-57. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
66. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 39(1):1-18. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07428-3.
67. 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. doi: 10.1007/s10103-013-1426-y.
68. 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. doi: 10.1902/jop.2014.140392.
69. Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Kamath V, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sci Biol Med*. 2015; 6(Suppl 1):S102-9. doi: 10.4103/0976-9668.166100.
70. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10):981-90. doi: 10.1111/1469-0691.12651.
71. Sun X, Wang L, Lynch CD, Sun X, Li X, Qi M, et al. Nanoparticles having amphiphilic silane containing Chlorin e6 with strong anti-biofilm activity against periodontitis-related pathogens. *J Dent*. 2019; 81:70-84. doi: 10.1016/j.jdent.2018.12.011.
72. 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. doi: 10.1039/c7pp00389g.

73. Zhang T, Ying D, Qi M, Li X, Fu L, Sun X, et al. Anti-Biofilm Property of Bioactive Upconversion Nanocomposites Containing Chlorin e6 against Periodontal Pathogens. *Molecules*. 2019; 24(15):2692. doi: 10.3390/molecules24152692.
74. 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. doi: 10.1038/s41598-018-22687-x.
75. 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. doi: 10.1117/1.JBO.23.9.091412.
76. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys*. 2016; 26(12):123001. doi: 10.1088/1054-660X/26/12/123001.
77. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014; 5:405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.
78. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(1):1-18. doi: 10.1128/CMR.10.1.1-18.1997.
79. Pomposiello PJ, Dimple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46:319-41. doi: 10.1016/s0065-2911(02)46007-9.
80. Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, et al. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog*. 2017; 110:56-65. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015.
81. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira GJPL, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 25:43-49. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.003.
82. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001; 74(5):656-69. doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2.
83. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001; 19(1):29-33. doi: 10.1089/104454701750066910.
84. Seeger K. Semiconductor physics - an introduction. 6th ed. Austria: Springer; 1997.
85. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg*. 2005; 31(9 Pt 2):1199-205. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31926.

86. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21(5):249-58. doi: 10.1089/104454703322564451.
87. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2):167-71. doi: 10.1089/pho.2005.23.167.
88. Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(6):319-24. doi: 10.1089/104454702320901107.
89. Borekci T, Meseli SE, Noyan U, Kuru BE, Kuru L. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy in the treatment of generalized aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2019; 51(2):167-175. doi: 10.1002/lsm.23010.
90. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9(5):497-505. doi: 10.1002/lsm.1900090513.
91. Yeager RL, Franzosa JA, Millsap DS, Lim J, Heise SS, Wakhungu P, et al. Survivorship and mortality implications of developmental 670-nm phototherapy: dioxin co-exposure. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(1):29-32. doi: 10.1089/pho.2006.24.29.
92. Huang PJ, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(3):183-90. doi: 10.1089/pho.2007.2062.
93. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2):102-6. doi: 10.1089/pho.2006.2011.
94. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004; 47(16):3897-915. doi: 10.1021/jm040074b.
95. Fickweiler S, Abels C, Karrer S, Bäuml W, Landthaler M, Hofstädter F, et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 48(1):27-35. doi: 10.1016/S1011-1344(99)00004-4.
96. Karmakova T, Feofanov A, Pankratov A, Kazachkina N, Nazarova A, Yakubovskaya R, et al. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 82(1):28-36. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.08.006.
97. Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004; 5(4):397-408. doi: 10.2174/1389201043376805.

98. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5(8):497-508. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
99. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 23(2):131-8. doi: 10.1016/j.ejps.2004.06.004.
100. Oliveira DM, Lacava ZG, Lima EC, Morais PC, Tedesco AC. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6(8):2432-7. doi: 10.1166/jnn.2006.512.
101. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5):436-50. doi: 10.1039/b311900a.
102. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova.* 2007; 30(4): 988–994. doi: 10.1590/S0100-40422007000400039
103. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(3):221-41. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00126-1.
104. Kamuhabwa AR, Roelandts R, de Witte PA. Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 53(1-3):110-4. doi: 10.1016/s1011-1344(99)00135-9.
105. Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 1998; 111(2):327-32. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00278.x.
106. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(5-6):551-6. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04406.x.
107. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med.* 1983; 2(3):267-74. doi: 10.1002/lsm.1900020310.
108. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3):626-32. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x.
109. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95(2):71-80. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.005.
110. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6):2329-35. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

111. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4):1542-52. doi: 10.1128/AAC.49.4.1542-1552.2005.
112. Stupáková V, Varinská L, Mirossay A, Sarisský M, Mojzis J, Dankovcík R, et al. Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytother Res.* 2009; 23(6):827-32. doi: 10.1002/ptr.2681.
113. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x.
114. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005;38:9-12. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00112.x.
115. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1):89-96. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x.
116. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *JPhotochem Photobiol B.* 1992; 14(3):262-6. doi: 10.1016/1011-1344(92)85104-3.
117. 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. doi: 10.1177/0022034517752675.
118. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26(4):253-61. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00615.x.
119. Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, et al. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res.* 2014; 49(1):20-8. doi: 10.1111/jre.12073.
120. Millhouse E, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Patel N, Middleton AM, et al. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health.* 2014; 14:80. doi: 10.1186/1472-6831-14-80.
121. 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):325-333. doi: 10.1111/jre.12395.
122. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(17):7223-8. doi: 10.1073/pnas.0611328104.
123. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(4):279-93. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

124. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7):481-90. doi: 10.1038/nrmicro2337.
125. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(3):193-207. doi: 10.1111/j.1600-051x.1984.tb01323.x.
126. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998; 280(5361):295-8. doi: 10.1126/science.280.5361.295.
127. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(12):889-905. doi: 10.1093/jnci/90.12.889.
128. Wenzler JS, Böcher S, Frankenberger R, Braun A. Feasibility of transgingival laser irradiation for antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 28:75-79. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.08.030.
129. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003; 38(4):428-35. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.00673.x.
130. Longo M, Garcia V, Ervolino E, Alves ML, Duque C, Wainwright M, et al. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 25:92-102. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.014.
131. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(2):142-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.10.006.
132. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(12):1412-1421. doi: 10.1002/jemt.23101.
133. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623.
134. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018; 26(3):229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.
135. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.
136. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5):997-1009. doi: 10.1007/s10103-016-1942-7.

137. Trigo-Gutierrez JK, Sanitá PV, Tedesco AC, Pavarina AC, Mima EGO. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 24:212-219. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.10.005.
138. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 61(1):e01162-16. doi: 10.1128/AAC.01162-16.