



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



Júlia Batista Lessa

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina e6 em biofilmes
monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis***

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Júlia Batista Lessa

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina e6 em biofilmes
monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis***

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

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-
Barcelos**

Araraquara

2023

L638t	Lessa, Júlia Batista Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina e6 em biofilmes monoespécie de <i>Fusobacterium nucleatum</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> / Júlia Batista Lessa. -- Araraquara, 2023 36 p. : il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Daniela Leal Zandim-Barcelos 1. Fotoquimioterapia. 2. Biofilmes. 3. Periodontite. 4. Microbiologia. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Júlia Batista Lessa

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina e6 em biofilmes
monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis***

Orientador: Profa. Dra.:Daniela Leal Zandim-Barcelos

Assinatura Orientador (a): 

Assinatura Aluno (a): 

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

Ao meu avô Edimar (*in memoriam*)

Dedico esse Trabalho de Conclusão de curso ao meu querido avô, que sempre foi minha inspiração, e sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, até o último momento. Sua presença foi essencial na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Karine Batista Silva e Vinicius Zandonaidi, pelo carinho, dedicação e esforço durante toda a minha trajetória.

À minha orientadora Daniela Leal Zandim-Barcelos pela sua orientação, atenção e toda ajuda dedicada ao longo de todo o projeto.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - processo 1743 / 2020-1), pelo incentivo e pela bolsa concedida para a realização dessa pesquisa.

À minha família Batista por estarem sempre comigo.

Aos meus amigos Luis Gustavo de Souza Pardin, Leticia de Freitas Carvalho, Leticia Pereira Lima Durão, Maria Fernanda Rath, Milena Gimenes, Natasha Prates, Rayssa Soares e Verônica Canela, que compartilharam a vida e todos esses anos de curso, estiveram sempre ao meu lado e foram essenciais nessa jornada.

À minha dupla Raphaela Sartori da Silva, por todo o aprendizado compartilhado em todas as nossas clínicas juntas.

Lessa JB. Terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Clorina e6 em biofilmes monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) é considerada a terapia não-cirúrgica de escolha para tratamento da doença periodontal. No entanto, esta terapia pode apresentar limitações e insucessos quando utilizada isoladamente em determinados casos clínicos. Assim, terapias alternativas têm sido investigadas para suprir deficiências da RAR que podem estar relacionadas ao limitado acesso à superfície radicular, a presença persistente de periodontopatógenos nas bolsas mais profundas e a habilidade de algumas bactérias em invadir tecidos adjacentes. Dentre estas terapias, destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aPDT com utilização da clorina-e6 (Ce6) em diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilme monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Foi realizada a padronização da formação do biofilme seguindo parâmetros de densidade óptica e contagem de colônias conforme curva de crescimento estabelecida previamente. Os biofilmes monoespécie de *F. nucleatum* e de *P. gingivalis* foram formados em condições de atmosfera e meio de crescimento adequadas por 5 dias. Posteriormente, estes biofilmes foram tratados com diferentes protocolos, incluindo controle positivo (clorexidina – CHX 0,2%) e negativo (água destilada + DMSO 1%), grupos tratados apenas com fotossensibilizador (FS), grupos tratados apenas com luz e grupos tratados com aPDT (FS + luz). Foram testadas duas concentrações da Ce6 (100 e 200 μM), dois comprimentos de onda (emitidos em azul e vermelho) e uma intensidade de luz (30 J/cm^2). A análise quantitativa foi realizada por contagem de colônias e transformadas em UFC/mL. A distribuição dos dados foi verificada por meio de teste de Shapiro Wilk, com posterior análise de variância (ANOVA) de um fator com correção de Welch e pós teste de Games-Howell, considerando um nível de significância de 5%. A aPDT com irradiação da Ce6 nos dois espectros de luz promoveu a eliminação total de *P. gingivalis* em ambas as concentrações de FS testadas. Por outro lado, a irradiação com luz vermelha foi mais eficaz na eliminação de *F. nucleatum*, provocando redução microbiana de 3,44 e 3,46 $\log_{10}$ para a menor e maior concentração de Ce6, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo. Tendo em vista o significativo efeito antimicrobiano sobre biofilme de bactérias periodontopatogênicas como a *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, a aPDT com utilização da Ce6 pode ser considerada uma alternativa promissora de terapia coadjuvante à RAR no tratamento da doença periodontal.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Biofilmes. Periodontite. Microbiologia.

LESSA JB. Antimicrobial Photodynamic Therapy with the Use of Chlorine e6 in Monospecies Biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Root scaling and planing (RAR) is considered the non-surgical therapy of choice for the treatment of periodontal disease. However, this therapy may present limitations and failures when used alone in certain clinical cases. Thus, alternative therapies have been investigated to overcome RAR deficiencies that may be related to limited access to the root surface, the persistent presence of periodontopathogens in deeper pockets and the ability of some bacteria to invade adjacent tissues. Among these therapies, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) stands out. The aim of this study was to evaluate the effect of aPDT with the use of chlorin-e6 (Ce6) at different concentrations and wavelengths on a single species biofilm of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. The standardization of biofilm formation was carried out following parameters of optical density and colony count according to the previously established growth curve. The monospecies biofilms of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* were formed under appropriate conditions of atmosphere and growth medium for 5 days. Subsequently, these biofilms were treated with different protocols, including positive control (chlorhexidine - CHX 0.2%) and negative control (distilled water + DMSO 1%), groups treated only with photosensitizer (PS), groups treated only with light and groups treated with aPDT (FS + light). Two concentrations of Ce6 (100 and 200 μ M), two wavelengths (emitted in blue and red) and one light intensity (30 J/cm²) were tested. Quantitative analysis was performed by counting colonies and transforming them into CFU/mL. Data distribution was verified using the Shapiro Wilk test, with subsequent one-way analysis of variance (ANOVA) with Welch correction and post Games-Howell test, considering a significance level of 5%. aPDT with Ce6 irradiation in both light spectra promoted the total elimination of *P. gingivalis* in both PS concentrations tested. On the other hand, irradiation with red light was more effective in eliminating *F. nucleatum*, causing a microbial reduction of 3.44 and 3.46 log₁₀ for the lowest and highest concentration of Ce6, respectively, when compared to the negative control. In view of the significant antimicrobial effect on the biofilm of periodontopathogenic bacteria such as *P. gingivalis* and *F. nucleatum*, aPDT using Ce6 can be considered a promising alternative for adjuvant therapy to RAR in the treatment of periodontal disease.

Keywords: Photochemotherapy. Biofilms. Periodontitis. Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Microrganismos.....	19
4.2 Processamento da saliva humana.....	19
4.3 Formação de biofilme	20
4.4 Tratamento dos biofilmes e análise quantitativa.....	20
4.5 Análise de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	21
4.6 Análise dos resultados	21
5 RESULTADO	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29
ANEXO A	35
ANEXO B	36

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal apresenta-se predominantemente associada a interação de bactérias com diferentes virulências, que apresentam fatores modificadores da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, especialmente quando estes microorganismos estão organizados em forma de biofilme maduro e localizados no sulco gengival^{1,2}. A Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) é considerada a terapia padrão ouro para o controle da microbiota patogênica presente em condição de doença instalada, porém, quando abordada isoladamente em determinados quadros clínicos, esta terapia pode demonstrar-se insuficiente para o restabelecimento da homeostasia tecidual. Desta forma, terapias alternativas têm sido sugeridas em virtude do limitado acesso à superfície radicular durante RAR^{3,4}, da presença de periodontopatógenos residuais em bolsas periodontais tratadas e da capacidade de algumas bactérias em invadir tecidos adjacentes⁵. Quando consideramos o tratamento de doença periodontal instalada, de caráter crônico ou agressivo, o uso de antibióticos locais ou sistêmicos é apresentado como alternativa e o seu uso como coadjuvante pode induzir efeitos sistêmicos indesejáveis como a formação de espécies bacterianas resistentes à terapia medicamentosa⁶. Assim, infecções antes triviais podem se tornar intratáveis por antibióticos convencionais.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – Photodynamic Antimicrobial Therapy) tem se destacado como um procedimento capaz de induzir a morte rápida e localizada de microrganismos indesejáveis, evitando a manutenção de altas concentrações de fármacos (antibióticos e antissépticos) por longo período e eliminando o risco à resistência bacteriana⁷. Diversos estudos comprovam a eficácia da aPDT, tanto in vitro como in vivo, em animais e humanos, no tratamento da doença periodontal⁸⁻¹³. Sua indicação na terapia de manutenção tem como vantagem o menor desgaste da superfície radicular, que seria um aspecto negativo da utilização da técnica convencional (RAR). Neste caso a aPDT seria utilizada isoladamente, reduzindo a incidência de hipersensibilidade causada pela remoção de cimento nas múltiplas sessões de RAR¹³.

A aPDT consiste na excitação da molécula (em seu estado fundamental) do fotossensibilizador (FS) por uma luz no espectro visível (laser de diodo semicondutores de baixa potência), com a energia absorvida, esta molécula pode

sofrer transição ao estado 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. 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 células¹⁴. 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 PS pode gerar 10.000 moléculas de oxigênio singleto. 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 formação¹⁵.

Diversos fotossensibilizadores estão descritos na literatura, sendo as fenotiazinas azul de metileno e azul de toluidina, os mais referidos¹⁶⁻¹⁹. Como alguns estudos não têm demonstrado vantagens clínicas do uso da aPDT com estes FS no tratamento periodontal^{20,21}, novos FS estão surgindo com o intuito de superar as deficiências destes citados anteriormente.

Inicialmente utilizada em terapias oncológicas, a clorina-e6 (Ce6) surgiu em meados dos anos 90 como um FS de segunda geração bastante promissor²². A clorina e seus derivados estão sendo utilizados em diversos tratamentos com utilização de luz, como cânceres^{23,24}, leucoplasias²⁵, infecções endodônticas²⁶. 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 colônia (UFC)²⁷⁻²⁹.

Fotossensibilizadores à base de clorina apresentam dois picos de absorção de luz, na luz vermelha (~660 nm) e azul (~412 nm)³⁰. Tradicionalmente, a luz vermelha é preferida por se acreditar em sua maior capacidade de penetração nos tecidos. Porém, comprimentos de onda em torno de 412 nm apresentaram 30-33% maior coeficiente de absorção de energia e efeito bactericida que comprimentos de onda equivalentes a luz visível vermelha^{31,32}, o que pode tornar promissor o seu uso na terapia antimicrobiana. Em um estudo de otimização de solventes utilizados na diluição de FS, foi possível observar maior espectro de absorção quando a Ce6 foi diluída em solventes polares e excitada sobre comprimentos de onda de luz azul³³.

De maneira geral, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da aPDT com utilização da clorina como fotossensibilizador contra microorganismos

associados à doença periodontal^{27-29,34,35}. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu recentemente um estudo que avaliou quantitativamente o efeito antimicrobiano da Ce6 na aPDT frente a biofilmes monoespécie de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e os resultados foram bastante promissores. Além disto, até o presente momento, não existem relatos na literatura do emprego da aPDT com uso da Ce6 como terapia coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Assim, o presente projeto investigará o efeito da terapia fotodinâmica com utilização da Ce6 em biofilme monoespécie de outros dois patógenos periodontais.

2 PROPOSIÇÃO

Determinar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com utilização da Ce6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda (ativação por luz azul e luz vermelha) em biofilme simples de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, habitualmente conhecida pela sigla aPDT, do inglês "Antimicrobial Photodynamic Therapy", vem sendo uma modalidade de tratamento altamente estudada nas últimas décadas, principalmente nas áreas de Medicina e Odontologia. Tal proposta terapêutica faz o uso da luz, em seu espectro visível, e em associação a um fotossensibilizador (FS) de escolha. Originalmente, o tratamento foi proposto para detectar e tratar diferentes neoplasias malignas, tumores e doenças dermatológicas, na área de Medicina, e durante os últimos anos vemos cada vez mais o surgimento de estudos propondo sua utilização na Odontologia, principalmente nas áreas de Periodontia e Endodontia. O principal objetivo da aPDT, é inativar ou reduzir a ação de microrganismos, células e moléculas, onde o FS (sensível à luz) é excitado em presença da luz visível, sendo assim capaz de formar radicais livres de oxigênio singelo, atuando então como agentes tóxicos aos microrganismos presentes na região³⁶.

Sabe-se que na Periodontia, os procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) objetivam controlar a infecção e a inflamação nos tecidos periodontais, e reduzir ou eliminar o biofilme bacteriano. Porém, o tratamento mecânico de RAR, considerado o padrão ouro, apresenta certas limitações e taxas de insucessos, devido a variáveis ao longo do tratamento. Desta maneira, a aPDT surge como um tratamento coadjuvante e auxiliador contra bactérias periodontopatogênicas³⁷.

O mecanismo de ação da aPDT ocorre devido a associação de elementos como o FS de escolha, a fonte de luz e o oxigênio molecular. De acordo com Agostinis et al.³⁸, o FS é composto por uma substância fotossensível que é capaz de absorver luz com comprimentos de onda apropriado, assim ocorrendo a transformação da luz em energia excitatória do oxigênio molecular. De maneira resumida, o FS é submetido a luz e passa do estado de baixa energia para um elevado grau de excitação. Nesse momento podem ocorrer duas reações: passar para um nível anterior e liberar fluorescência ao meio ou passar para o nível de maior energia ou excitação tripleto, altamente energizado, que possui mais tempo de vida e produz espécies altamente reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto que é capaz de promover a degradação de moléculas biológicas. De tal forma, a fonte de luz precisa ser absorvida e, assim, penetrar nos tecidos em tratamento com o comprimento de onda adequado para que

ocorra a excitação do FS que estimula o oxigênio molecular a se transformar em espécies reativas com potencial efeito citotóxico. Para que ocorra a adequada absorção e distribuição do FS às células alvo, deve-se adequar os períodos de pré-irradiação, de acordo com o próprio FS escolhido e a fonte de luz utilizada.

Entre várias opções de fonte de luz, destaca-se o uso de lâmpada convencional branca, fotopolimerizadores, lasers, lâmpada de xenônio com filtro vermelho e o LED (diodo emissor de luz), cada uma apresentando vantagens e desvantagens de uso³⁹. Segundo Matevski et al.³⁹, deve-se atentar aos fatores relacionados à sua escolha, como o comprimento de onda apresentado, a potência, densidade, quantas aplicações são necessárias e qual a energia liberada nas áreas de tratamento e ainda, ao FS escolhido, em qual concentração ele será aplicado e qual o seu período de pré-irradiação para alcançar a eficiência desejada.

Para cumprir os objetivos da aPDT, absorver energia luminosa e assim reduzir a quantidade de microrganismos, os FS devem apresentar características como baixa toxicidade aos tecidos, rápida eliminação, pico de absorção referente a galena de absorção dos tecidos a serem irradiados, elevada solubilidade em água, manter-se estável quando armazenado e ter alto rendimento na produção de oxigênio singlete⁴⁰. Wainwright⁴⁰ cita diferentes FS que têm sido utilizados, como os Fenotiazínicos (620-660 nm), Fenazina (500-550 nm), Acridina (400-500 nm), Cianinas (500-600 nm), Portifirinas (600-650 nm), entre outros tipos. Para uso na aPDT, destacam-se o azul de metileno com faixa de absorção entre 610-660 nm, e o azul de toluidina com absorção entre 530-630nm, mostrando-se bastantes eficientes para a inativação de bactérias periodontopatogênicas, gram-positivas e gram-negativas, sendo assim, os principais FS para a associação no tratamento periodontal⁴¹. Ainda assim, outros FS vêm sendo pesquisados e utilizados, como a clorina-e6, utilizada no presente trabalho.

Na presente Revisão de Literatura, foram selecionados 10 artigos publicados nos últimos 5 anos (2017-2022) que avaliaram o efeito da PDT, em ensaios clínicos randomizados, como um tratamento coadjuvante à RAR no tratamento não cirúrgico da periodontite.

Em 2017, Segarra-Vidal et al.⁴² avaliaram em 60 pacientes os efeitos da aPDT em associação à RAR no tratamento não cirúrgico da periodontite crônica. Desses pacientes, 20 eram saudáveis e constituíram o grupo controle, e 40 apresentavam periodontite crônica moderada a severa. Os pacientes com periodontite foram divididos em dois grupos, no primeiro grupo foi realizado apenas a RAR e no segundo

foi feita associação da RAR e aPDT. Parâmetros clínicos periodontais, microbiológicos e bioquímicos foram analisados e registrados. Como resultado, observou-se melhoras significativas nos parâmetros clínicos, porém sem diferenças significativas entre os grupos. Ainda assim, no grupo teste foi observada uma redução significativa de *A. actinomycetemcomitans*. Desta forma, os autores concluíram que a associação da aPDT não resultou em benefícios adicionais no tratamento da periodontite quando comparada ao tratamento apenas com RAR.

Também em 2017, Ricci Donato et al.⁴³ compararam os efeitos de dois fotossensibilizadores, o Photogem e a Curcumina Natural, na inativação microbiológica quando irradiados com o laser de diodo em 630 nm e 450 nm. Nesse estudo, técnicas alternativas para a inativação de microrganismos patogênicos na mucosa oral e tecidos periodontais foram avaliados, como uma alternativa aos enxaguatórios bucais que apresentam uma série de desvantagens. Assim, 50 pacientes foram separados em cinco grupos, e para cada fotossensibilizador houve o controle negativo, controle de luz e duas concentrações do FS, sendo uma de 25 mg/L e outra de 100 mg/L. Em cada paciente foi feito um bochecho com as soluções dos fotossensibilizadores e a irradiação de luz. Foi realizada a coleta de saliva antes, logo após, e 24 horas após o bochecho e a irradiação de luz, podendo assim, comparar a diferença entre a formação de unidades formadoras de colônia, em cada paciente. Como resultado, observou-se que, independente do FS utilizado, houve redução significativa após o tratamento realizado. Porém, após 24h, houve uma redução microbiana mais significativa nos grupos em que a curcumina natural foi utilizada. Os pesquisadores puderam concluir que a curcumina natural é um FS mais viável, por apresentar maior eficiência após maior período de tempo do que o Photogem. Mas independente do FS utilizado, ainda notaram que a aPDT, mostra-se como uma técnica promissora para redução bacteriana.

No estudo de Sethi e Raut⁴⁴, em 2019, foram verificadas melhoras significativas após três meses da utilização da aPDT com a indocianina verde como FS e o laser de diodo com 810 nm de comprimento de onda como fonte de luz. Os parâmetros clínicos foram avaliados antes e após 3 meses do tratamento em 30 pacientes que apresentavam periodontite crônica, com profundidade de sondagem e nível de inserção clínica maiores que 5 mm e 4 mm, respectivamente. Tais pacientes foram divididos em dois grupos, o grupo controle, onde foi realizado o tratamento de raspagem convencional, e o grupo teste, onde associou-se a aPDT com a RAR. Os

parâmetros clínicos observados ao final dos 3 meses foram: índice de placa e sangramento à sondagem, recessão gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Vale ressaltar que nesse estudo nenhum dos pacientes selecionados fizeram uso de terapia antibiótica ou terapia convencional durante o ano anterior à pesquisa. Como resultados encontrados após os 3 meses de tratamento, observou-se uma redução significativa de todos os parâmetros clínicos do grupo teste em comparação ao grupo controle. Foi concluído, então, que a indocianina verde pode ser utilizada como alternativa a outros fotossensibilizadores, combinada ao laser de diodo, como terapia auxiliar no tratamento da periodontite crônica.

Ainda em 2019, Al-Khureif et al.⁴⁵ avaliaram a eficácia da aPDT em pacientes com periodontite severa, estágios III ou IV e grau C, observando tanto os resultados clínicos quanto os imunológicos. Nesse ensaio clínico, 17 pacientes, com idade inferior a 35 anos, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: no grupo I foi realizada a aplicação de quatro sessões de aPDT (imediatamente após, 3, 7 e 14 dias após RAR) com utilização do laser de diodo de 670 nm de comprimento de onda e o cloreto de fenotiazina como FS, e no grupo II foi feita administração sistêmica de Metronidazol 500 mg e Amoxicilina 500mg, 3 vezes ao dia durante 7 dias consecutivos, em associação também à RAR. Os resultados, após 3 meses de avaliação, mostraram que ambas as terapias levaram a uma melhora significativa em parâmetros como sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Em conclusão, ficou claro que a terapia fotodinâmica apresentou eficácia frente a bolsas periodontais profundas e severas. No entanto, quando houve a combinação de terapia antimicrobiana e RAR foi possível observar diminuição dos níveis pró inflamatórios no que se refere a periodontite grau C e estágio III ou IV. Dessa maneira, nota-se que ambas as terapias podem exercer um grande papel no auxílio da terapia convencional.

Niazi et al.⁴⁶ (2019) investigaram diferentes modalidades de terapias para o tratamento adjuvante das doenças periodontais necrosantes (PUN) em pacientes HIV positivos. Visto que estes pacientes apresentam uma resposta imunológica deficiente, a terapia convencional de RAR, nem sempre leva à remoção completa dos agentes bacterianos. Dessa forma, 24 pacientes soropositivos e 30 soronegativos foram divididos em 4 grupos, de acordo com o protocolo a ser seguido, sendo eles RAR aplicada isoladamente, RAR associada a aPDT tanto no grupo de soropositivos quanto no grupo de soronegativos. Os pacientes foram avaliados após 3 e 6 meses

de tratamento. Como resultados, uma melhora significativa no índice de placa, sangramento à sondagem, e profundidade de sondagem, e um ganho de inserção clínica foi observado em todos os grupos. Dessa maneira, concluiu-se que a aPDT, usada de forma coadjuvante ao tratamento de RAR, foi eficaz e mostrou melhorias nos parâmetros clínicos de pacientes HIV positivos. A diferença não foi grande quando se comparado ao grupo de HIV negativos, mas tal terapia auxiliar demonstra um mecanismo a mais no controle dos pacientes inumocomprometidos.

Borecki et al.⁴⁷ (2019) demonstraram benefícios da aPDT como terapia auxiliar à RAR no tratamento não cirúrgico da periodontite agressiva generalizada que causa uma rápida perda de inserção devido a grande quantidade de bactéria periodontopatogênicas encontradas, como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Neste estudo, 24 pacientes sem nenhuma alteração sistêmica, não fumantes e que apresentam a periodontite agressiva generalizada, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um onde apenas a RAR foi realizada e outro, onde houve a associação da RAR com a aPDT. Os parâmetros clínicos índice de placa, sangramento à sondagem, nível de inserção, mobilidade dentária, profundidade de sondagem e recessão gengival foram observados inicialmente e após 63 dias do protocolo de tratamento. Como resultados, foi observada uma maior redução nos parâmetros clínicos e nos parâmetros microbiológicos no grupo teste em comparação com o grupo controle. No entanto, as diferenças observadas entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Considerando os parâmetros analisados no estudo, os autores concluíram que o uso da aPDT associado à RAR não resultou em benefícios significativos para o tratamento da periodontite agressiva generalizada.

AlAhmari et al.⁴⁸ (2019) investigaram, em 83 pacientes do sexo masculino, sendo 42 fumantes e 41 não fumantes, a eficácia da aPDT em associação à RAR. Tanto os indivíduos fumantes quanto os não fumantes foram divididos em dois grupos, um em que apenas a RAR foi realizada e outro em que a RAR foi associada à aPDT. Os parâmetros clínicos foram avaliados no início, após 1 e 3 meses do tratamento. Foi observado que os parâmetros clínicos apresentavam-se maiores nos grupos de pacientes fumantes do que nos não fumantes. Além disso, nos grupos de não fumantes os resultados foram comparáveis após os 3 meses de acompanhamento. Conclui-se, então, que a aPDT não tem grande relevância em pacientes fumantes, podendo ter seus resultados comprometidos pelo fumo, mas também não apresentou

grandes diferenças entre os grupos de não fumantes. Dessa forma, sua importância no tratamento periodontal ainda se mostra questionável.

No estudo de Katsikanis et al.⁴⁹ (2020), vinte e um pacientes acometidos por doença periodontal moderada a severa, com pelo menos três sítios com profundidade de sondagem acima de 5mm, foram incluídos. O objetivo foi avaliar a eficácia do uso auxiliar da aPDT, utilizando o azul de metileno como FS e o laser de baixa potência (670 nm) como fonte de luz, e também a eficácia de um laser de diodo (940 nm) de alta intensidade em comparação com o tratamento mecânico convencional de RAR. Foi utilizado o modelo de boca dividida, onde a RAR foi feita em todos os quadrantes, e cada quadrante recebeu aleatoriamente um dos seguintes tratamentos: RAR (grupo controle), RAR e laser de diodo e RAR com aPDT. Os resultados foram avaliados após 3 e 6 meses do tratamento. Todos os grupos de tratamento promoveram melhorias clínicas estatisticamente significantes em comparação com os valores iniciais pré-tratamento após a avaliação de 3 e 6 meses. Entretanto, não houve diferença significativa nos parâmetros de profundidade de sondagem e sangramento à sondagem entre os grupos. Sendo assim, pode-se observar que nem o laser de diodo e nem a aPDT mostraram benefícios adicionais ao tratamento mecânico convencional. Assim, concluiu-se também que mais estudos sobre a aPDT são necessários para comprovar sua necessidade na prática clínica.

Muzaheed et al.⁵⁰ (2020) avaliaram o efeito de sessões únicas ou múltiplas da aPDT como terapia auxiliar à RAR para a eliminação de bactérias periodontopatogênicas em pacientes com periodontite moderada, grau B. O objetivo do estudo foi determinar se sessões múltiplas de aPDT resultam em maior eficácia na redução da inflamação do que uma sessão única após a RAR. Dessa maneira, 45 pacientes foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: grupo I foi submetido a RAR + aPDT, grupo II, RAR + aPDT inicial e após 1 mês, e grupo III, RAR + aPDT inicial, e após 1 e 3 meses. Os parâmetros clínicos índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e perda óssea e de inserção foram avaliados inicialmente e após 6 meses. Também foi realizada análise microbiológica nos mesmos períodos de avaliação. Como resultados microbiológicos, verificou-se que o primeiro grupo apresentava maiores índices de contagem de bactérias que aqueles que foram submetidos a mais de uma sessão de aPDT. Clinicamente, foi verificado que no grupo I não houve diferença significativa entre os parâmetros clínicos avaliados inicialmente e após 6 meses de tratamento. Por outro lado, melhoras significativas nos

parâmetros clínicos foram verificadas nos grupos II e III. Assim, conclui-se que a aplicação de pelo menos duas sessões de aPDT após a terapia convencional resulta em maior redução dos níveis de inflamação e do número de bactérias, além de maiores benefícios clínicos do que apenas uma única sessão.

Cláudio et al.⁵¹ (2021) selecionaram 34 pacientes entre 30 a 70 anos de idade que apresentavam o diagnóstico de diabetes tipo 2 descompensado e periodontite estágios III e IV, grau C. Estes pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (RAR) e o grupo teste (RAR + aPDT). Na aPDT a aplicação do azul de metileno e do laser de diodo de 660 nm foi realizada imediatamente, 48 e 98 horas após a RAR. Uma redução significativa no sangramento à sondagem e no número de bolsas com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm foi observado após 90 e 180 dias do tratamento no grupo teste em comparação com o grupo controle. Assim, foi possível concluir, que o protocolo da terapia fotodinâmica com aplicações múltiplas após a realização do tratamento mecânico convencional resultou em benefícios clínicos para os pacientes portadores de diabetes descompensada e doença periodontal severa.

Os artigos incluídos nesta Revisão de Literatura mostram que diferentes abordagens e protocolos de terapia fotodinâmica têm sido utilizados como terapia coadjuvante para o tratamento da periodontite. Foram identificadas abordagens em pacientes sistemicamente comprometidos, como em pacientes portadores de diabetes descompensada⁵¹ ou HIV positivos⁴⁶, em pacientes fumantes⁴⁸ e também no tratamento da periodontite anteriormente classificada como agressiva⁴⁷. A associação das terapias se mostrou altamente eficiente em alguns estudos^{43-46,50,51}; porém, em outros não foram detectadas diferenças significativas que justifiquem seu uso^{42,47-49}. Assim, a aPDT pode ser considerada uma terapia bastante promissora em determinados casos, mas que ainda necessita de mais estudos para definição e padronização de protocolos eficazes.

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo procurou observar o impacto da terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada em conjunto com o fotossensibilizador de escolha, a clorina-e6, em biofilmes monoespécie de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyronomas gingivalis*. Toda a metodologia e materiais utilizados serão descritos nesta sessão.

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas monoespécie de referência de *Fusobacterium nucleatum* (ATCC® 25586TM) e *Porphyronomas gingivalis* (ATCC® 33277TM).

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar brucela (Agar Brucella, Neogen, Idaiatuba, SP, Brasil; placa de Petri 90x10cm, Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 5% (Microlab, Campinas, SP, Brasil), extrato de levedura (6 g/L), hemina (10 mg/mL) e menadiona (5 mg /mL), a 37 °C em condições atmosféricas adequadas para formação de biofilme periodontopatogênico com cepas bacterianas anaeróbias, e mantidas em câmara de anaerobiose (VA 500, Don Whitley Scientific, Inglaterra) com mistura de gases 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂ (White Martins, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após 48 h, as colônias bacterianas foram transferidas para 10 mL de meio líquido (BHI - Difco Laboratories Inc, MI, EUA) suplementado com extrato de levedura (6 g/L), hemina (10 mg/mL) e menadiona (5 mg/mL), e incubadas nas condições descritas anteriormente por 24 h.

4.2 Processamento da saliva humana

Antes da coleta da saliva humana, o protocolo de pesquisa foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Após aprovação (CAAE 23396619.5.0000.5416), a saliva foi obtida, sem estímulo, de homens jovens saudáveis, sem cárie ativa ou doença periodontal, sem aparelho ortodôntico, sem doença sistêmica, em jejum e sem escovação dentária nas 12h que antecederam a coleta, e sem relato de uso de antibióticos por pelo menos seis meses antes da coleta. A saliva foi processada seguindo protocolo descrito por Tavares et al.⁵².

4.3 Formação do biofilme

Foi determinada a curva de crescimento (fase exponencial) por meio da densidade óptica (Eppendorf BioPhotometer® D30, Hamburg, Alemanha) e UFC/mL⁵². 200 µL de cada suspensão bacteriana correspondendo a 1×10^7 UFC/mL foi adicionado a cada poço em placas de microtitulação de 96 poços estéreis (Fisher Scientific, NY, USA). As placas de cultura celular contendo o microrganismo em meio de crescimento foram incubadas em atmosfera apropriada a 37°C durante 5 dias, garantindo condições favoráveis ao crescimento do microrganismo. O meio foi trocado após 24, 48, 72 e 96 h por aspiração do meio consumido e a adição de meio fresco (200 µL)⁵³. Esses experimentos foram conduzidos em 3 repetições independentes. Para o biofilme monoespécie de *P. gingivalis*, 50 µL de saliva foram previamente adicionados aos poços e a placa foi mantida em agitador orbital (Incubadora 430 RD, Nova Etica, Brasil), 75 rpm a 37°C por 4h⁵².

4.4 Tratamento dos biofilmes e análise quantitativa

Após a formação dos biofilmes monoespécie, cada poço foi lavado duas vezes com PBS estéril e o biofilme tratado de acordo com os grupos estabelecidos (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos e protocolos de tratamento

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

Fonte: Elaboração própria.

No grupo controle positivo, foi utilizada clorexidina (CHX) na concentração de 0,2% durante 5 min. No caso dos grupos tratados com clorina, 200 µL das diferentes concentrações do fotossensibilizador foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas no escuro por 5 min (tempo pré-irradiação). Uma solução stock de Ce6 ($C_{34}H_{36}N_4O_6$; Peso molecular: 596,67) foi diluída em Dimetilsulfóxido absoluto (DMSO, Sigma Aldrich) na concentração de 20 mM. Soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição da solução stock em água destilada, nas concentrações de 200 µM (1% DMSO). Foi utilizado um tempo de irradiação de 22 min e 40 s para a luz azul (22 mW/cm²), e 26 min e 20 s para a luz vermelha (19 mW/cm²), ambos correspondentes a 30 J/cm². Os biofilmes serão irradiados uniformemente com sistema de iluminação a LED (BioTable, Laboratório de Apoio Tecnológico, IFSC-USP, São Carlos, SP, Brasil) em comprimento de onda de 450 nm ou 660 nm. O controle negativo recebeu apenas uma solução de água com 1% DMSO.

4.5 Análise de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Na avaliação quantitativa de células bacterianas viáveis de biofilmes simples, o método utilizado para contagem foi o das diluições seriadas, onde a partir da suspensão final de cada poço, suspensão considerada inicial (100) para o procedimento de contagem, foram feitas 5 diluições, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para cada grupo. De cada diluição foi pipetada 25 µL em cada quadrante sobre meio de cultura apropriado (ágar sangue) contido em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose, para ocorrer a multiplicação bacteriana a ponto de surgirem colônias visíveis a olho nu, sendo que cada colônia visível corresponde a uma UFC. Segundo esta técnica de contagem deve-se escolher as placas que apresentam de 30 a 300 UFC para cálculo do número de UFC/mL. Este número é multiplicado pelo fator da diluição para se obter o valor de UFC/mL presentes na solução inicial a partir da qual foram feitas as demais diluições em série. Em seguida, os valores obtidos foram convertidos para log de base 10.

4.6 Análise dos resultados

Os dados numéricos da análise microbiológica foram agrupados em tabelas e submetidos à análise estatística, de forma a permitir a comparação entre os diferentes grupos experimentais. A distribuição dos dados foi checada por meio de teste de Shapiro Wilk, com posterior análise de variância (ANOVA) de um fator com correção

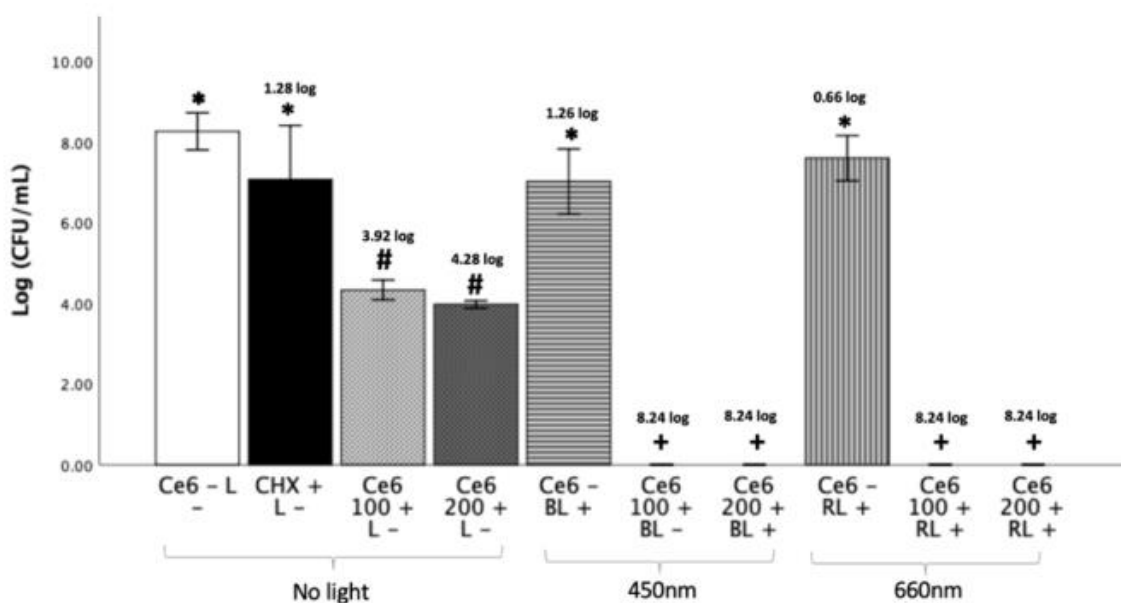
de Welch e pós teste de Games-Howell, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADO

A aPDT com irradiação da Ce6 nos dois espectros de luz promoveu a eliminação total de *P. gingivalis* em ambas as concentrações de fotossensibilizador testadas (Figura 1), sem diferença estatística entre as duas concentrações de Ce6 testadas.

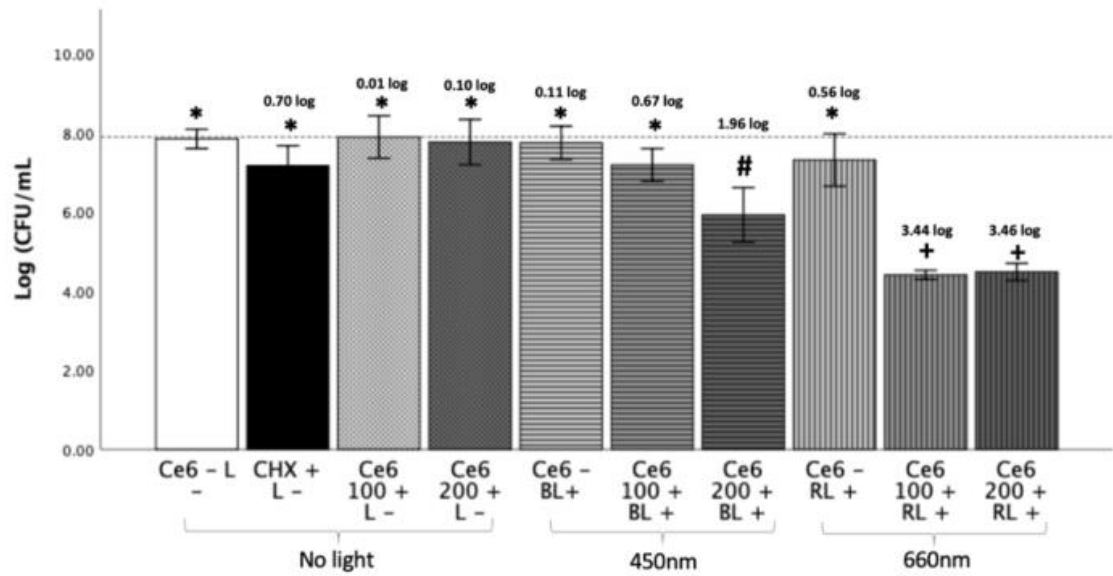
Por outro lado, a irradiação com luz vermelha foi mais eficaz na eliminação de *F. nucleatum*, provocando redução microbiana de 3,44 e 3,46 log₁₀ para a menor e maior concentração de Ce6, respectivamente (Figura 2). Apenas a irradiação com luz azul da Ce6 na concentração de 200 µM promoveu redução bacteriana significativa (1,96 log₁₀) em relação ao controle negativo (Figura 2).

Figura 1 - Valores de UFC/mL convertidos em log de base 10, primeira, segunda e terceira repetição (n=9) para *Porphyromonas gingivalis*



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Valores de UFC/mL convertidos em log de base 10, primeira, segunda e terceira repetição (n=9) para *Fusobacterium nucleatum*



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

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

É importante salientar que a aPDT não é um tratamento substituto da Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) ou de qualquer outro tratamento odontológico convencional, mas sim, um tratamento complementar e coadjuvante para doenças relacionadas a microrganismos patogênicos e resistentes. Em uma revisão sistemática com metanálise⁵⁴, foi concluído que a aPDT sozinha não proporciona eficácia superior no tratamento da doença periodontal quando comparada à RAR e que o seu uso como terapia coadjuvante à RAR proporcionou benefícios em curto prazo. No entanto, as evidências sobre os benefícios da aPDT como terapia coadjuvante no tratamento não-cirúrgico da periodontite ainda são limitadas e heterogêneas⁵⁵.

A aPDT tem sido indicada como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite, retratamento de bolsas residuais, descontaminação para terapia cirúrgica, terapia de manutenção, dentre outros. No entanto, ainda não existe na literatura um protocolo padronizado sobre como realizar a aPDT no tratamento da doença periodontal. Observa-se a presença de muitas variáveis, como tipo e concentração do fotossensibilizador, luz, tempo de pré-irradiação, comprimento de onda, fluência e densidade de energia do laser⁵⁶.

Diversos fotossensibilizadores têm sido empregados na aPDT para tratamento da doença periodontal, sendo o azul de metileno e azul de toluidina os mais utilizados^{9,16-19}. Até o presente momento, poucos estudos avaliaram o efeito antimicrobiano da aPDT com utilização da Ce6 contra microrganismos associados à doença periodontal^{27-29,34,35}, e não foram encontrados estudos in vivo que avaliaram o efeito da aPDT mediada pela Ce6 no tratamento da doença periodontal. Assim, este estudo foi realizado para investigar o efeito da aPDT com utilização da Ce6 em diferentes concentrações e comprimentos de onda em biofilmes monoespécie de microrganismos relacionado a doença periodontal, o *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Relatório Final PIBIC Edital 2019/2020), foi verificado que a aPDT com utilização da Ce6 nas concentrações de 100 e 200 μM foi capaz de reduzir significativamente a contagem de *A. actinomycetemcomitans*, sendo este efeito mais expressivo para a luz azul (3,89 e 4,01 log10 respectivamente para menor e maior concentração do fotossensibilizador) do que para a luz vermelha (0,99 e 1,03 log10, respectivamente para menor e maior concentração do fotossensibilizador).

No presente estudo, os resultados obtidos para o biofilme monoespécie de *P. gingivalis* foram superiores aos obtidos anteriormente para o biofilme de *A. actinomycetemcomitans*. A aPDT com utilização da clorina-e6 resultou na eliminação total dos microrganismos em ambas as concentrações testadas tanto para a irradiação com a luz vermelha como para a luz azul. A expressiva eliminação da *P. gingivalis* pode estar relacionada à limitação na formação do biofilme monoespécie desta bactéria periodontopatogênica ou pode também estar associada ao seu corante fotossensibilizador intrínseco. A *P. gingivalis* é um colonizador tardio que requer a presença prévia de receptores fornecidos pelos colonizadores de estágio intermediário para estabelecer uma forte adesão ao biofilme em desenvolvimento⁵⁷. Os substratos de poliestireno são diferentes da superfície do dente em que ocorre o desenvolvimento de biofilmes periodontais. Além disso, um potencial efeito fotodinâmico de um pigmento intracelular de *P. gingivalis* foi recentemente descoberto quando irradiado a 460 nm. Pesquisadores afirmaram que a irradiação com luz azul em *P. gingivalis* é potencialmente bactericida²⁷.

Para o biofilme simples de *F. nucleatum*, a irradiação da Ce6 com luz vermelha foi mais eficaz para a eliminação bacteriana. Uma redução bacteriana de 3,44 e 3,46 log10 foi observada para a menor e maior concentração de Ce6, respectivamente, quando a luz vermelha foi utilizada. A irradiação com luz azul promoveu uma redução bacteriana significativa (1,96 log10) apenas com utilização da Ce6 na concentração de 200 μM .

A significativa atividade bactericida contra patógenos periodontais isolados (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *A. odontolyticus*, *P. micra*, *A. rimae* e *S. exigua*) e biofilmes subgengivais in situ obtida por Ali e colaboradores⁵⁸ enfatizam a eficácia do uso de Ce6 como fotossensibilizador para aPDT usando vis+wIRA como fonte de luz contra um amplo espectro de bactérias periodontais. Uma redução maior que 3 Log10 (>99,9% de morte) na cultura

bacteriana foi demonstrada para todas as espécies testadas como culturas planctônicas únicas. Além disso, um biofilme subgengival agrupado in situ coletado de pacientes com periodontite foi eliminado quando a aPDT usando vis+WIRA foi combinada com Ce6. Este resultado foi determinado pela medição da UFC, revelando uma redução na carga bacteriana superior a 99,9%, e a quantificação de bactérias vitais dentro do biofilme subgengival usando coloração viva/morta em combinação com microscopia confocal de varredura a laser. Por outro lado, Tavares et al.⁵⁹ obtiveram menor redução bacteriana para biofilmes de *F. nucleatum* (1,12 log10) e *P. gingivalis* (2,66 log10) com utilização de um fotossensibilizador do tipo colina disponível comercialmente (Photodithazine® - PDZ) irradiado por luz vermelha (660 nm). Essa diferença pode ser explicada pela composição do PDZ que não é claramente divulgada.

Apesar do modelo de biofilme in vitro apresentar suas limitações, os resultados obtidos no presente estudo são relevantes para apoiar novos experimentos e para seguir para aplicação clínica da Ce6 como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica como terapia coadjuvante para a terapia periodotal.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista o significativo efeito antimicrobiano sobre biofilme de bactérias periodontopatogênicas como a *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, a aPDT com utilização da clorina-e6 pode ser considerada uma alternativa promissora de terapia coadjuvante à RAR no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS*

1. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, periodontia Clínica. 11.ed. Elsevier: Rio de Janeiro; 2011.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; 38(1): 135-87.
3. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. J Periodontol. 1988; 59(4): 222-30.
4. 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(1): 109-40.
5. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by Porphyromonas gingivalis. Front Biosci. 2007; 12(8-12): 3965-74.
6. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. J Clin Periodontol. 1990; 17(7): 479-93.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Garcia VG, Longo M, Gualberto Junior EC, Bosco AF, Nagata MJH, Ervolino E et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. J Periodont Res. 2014; 49(5): 584-94.
11. 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.

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

12. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Bharmappa R et al. Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a clinical and microbiologic short term study. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(2): ZC08-12.
13. 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): 1213-7.
14. Martinez de Pinillos Bayona A, Mroz P, Thunshelle C, Hamblin MR. Design deatures for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 89(2): 192-206.
15. 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.
16. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 877-84.
17. Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LM, Adabo MD, Lopes T, do Carmo TH et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(1): 87-91.
18. 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.
19. Alwaeli HA, Al-khateeb SN, Al-sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. 2015; 30(2): 801-7.
20. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, Azaripour A et al. Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2016; 14: 93-7.
21. 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.
22. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009; 6(2): 94-6.
23. Wang L-X, Li J-W, Huang J-Y, Li J-H, Zhang L-J, O'Shea D et al. Antitumor activity of photodynamic therapy with a Chlorin derivative in vitro and in vivo. *Tumour Biol.* 2015; 36(9): 6839-47.

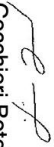
24. Nishie H, Kataoka H, Yano S, Yamaguchi 4, Nomoto A, Tanaka M et al. Excellent antitumor effects for gastrointestinal cancers using photodynamic therapy with a novel glucose conjugated Chlorin e6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 496(4): 1204-9.
25. Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10): 2595-601.
30. Silva JC, Ferreira-Strixino J, Fontana LC, Paula LM, Raniero L, Martin AA et al. Apoptosis- associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(4): 1429-36.
31. Huang L, Wand M, Huand YY, El-Hussei 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): 638-51.
32. 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.
33. Paul S, Heng PWS, Chan LW. Optimization in solvent selection for Chlorin e6 in photodynamic therapy. *J Fluoresc.* 2013; 23(2): 283-91.
34. 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.
35. 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.

36. Haas AN, Furlaneto F, Gaio EJ, Gomes SC, Palioto DB, Castilho RM et al. New tendencies in non-surgical periodontal therapy. *Brazilian Oral Research*. 2021; 35(suppl 2): e095.
37. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensibilization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from low-power laser. *Oral Microbiol Immune*. 1993; 8(3): 182-7.
38. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an up-date. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4): 250-81.
39. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered xenon lamp in vivo. *J Periodont Res*. 2003; 38(4): 428-35.
40. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(1):13-28.
41. Romito GA, Holzhausen M, Saraiva L, Pannutti CM, Villar CM. Estratégias terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e peri-implantar. Nova Odessa: Napoleão; 2015.
42. Segarra-Vidal M, Guerra-Ojeda S, Vallés LS, López-Roldán A, Mauricio MD, Aldasoro M et al. Effects of photodynamic therapy in periodontal treatment: A randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2017; 44(9): 915-25.
43. Ricci Donato HA, Pratavieira S, Grecco C, Brugnera-Júnior A, Bagnato VS, Kurachi C. Clinical Comparison of two photosensitizers for oral cavity decontamination. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35(2): 105-10.
44. Sethi KS, Raut CP. Antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green as a photosensitizer in treatment of chronic periodontitis: a clinico-microbial study. *Indian J Dent Res*. 2019; 30(6): 870-6.
45. Al-Khureif AA, Mohamed BA, Siddiqui AZ, Khan AA, Divakar DD. Repeated application of photodynamic and antibiotic therapy as an adjunct to root surface debridement in patients with grade C and stage III or IV aggressive periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101610.
46. Niazi FH, Koppolu P, Tanvir SB, Samran A, Algerban A. Clinical efficacy of photodynamic therapy in the treatment of necrotizing ulcerative periodontitis among HIV seropositive patients: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101608.
47. 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): 167-75.

48. AlAhmari F, Ahmed HB, Al-Kheraif AA, Javed Fawad, Akram F. Effectiveness of scaling and root planning with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis among cigarette-smokers and never-smokers: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2019; 25: 247-52.
49. Katsikanis F, Strakas D, Vourus I. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT, 670 nm) and diode laser (940 nm) as adjunctive approach in the conventional cause-related treatment of chronic periodontal disease: a randomized controlled split-mouth clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(5): 1821-7.
50. Muzaaheed, Acharya S, Hakami AR, Allemailem KS, Alqahtani K, Saffan AA et al. Effectiveness of single versus multiple sessions of photodynamic therapy as adjunct to scaling and root planing on periodontopathogenic bacteria in patients with periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32: 102035
51. Cláudio MM, Nuernberg MAA, Rodrigues JVS, Belizário LCG, Batista JA, Duque C et al. Effects of multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of periodontitis in patients with uncompensated type 2 diabetes: a randomized controlled clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 35: 102451
52. Tavares LJ, Klein MI, Panariello BHD, Dorigatti de Avila E, Pavarina AC. AN in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in single and dual species biofilms. *J Periodontal Implant Sci.* 2018; 48(1): 12-21.
53. Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, Francisconi RS, Bordini EAF, Marcantonio E, Spolidorio DMP. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. *Biofouling.* 2018; 34(6): 699-709.
54. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 669–82.
55. Salvi GE, Stähli A, Schmidt JC, Ramseier CA, Sculean A, Walter C. Adjunctive laser or antimicrobial photodynamic therapy to non-surgical mechanical instrumentation in patients with untreated periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2020; 47(S22): 176-98.
56. Theodoro LH, Garcia VG. Uso do laser e suas implicações como alternativa terapêutica na Periodontia e Implantodontia. In: Romito GA, Holzhausen M, Saraiva L, Pannuti CM, Villar CC. Estratégias terapêuticas atuais no manejo da doença periodontal e peri-implantar. Nova Odessa: Napoleão; 2017.
57. Theodoro LH, Garcia VG. Ervolino E. Efeitos da terapia fotodinâmica na Periodontia. In: Silva EB, Grisi DC. Periodontia no contexto interdisciplinar integrando as melhores práticas. Nova Odessa: Napoleão; 2015.

58. Ali-Ahmad A, Walankiewicz A, Hellwig E, Follo M, Tennert C, Wittmer A et al. Photoinactivation using visible light plus water-filtered infrared-A (vis+wIRA) and Chlorine e6 (Ce6) eradicates planktonic periodontal pathogens and subgingival biofilms. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1900.
59. 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.

ANEXO A - CERTIFICADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

		
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"		
Certificado		
Certifico que Julia Batista Lessa, portador do CPF número 114.958.286-38, realizou iniciação científica na Modalidade Bolsa PIBIC - CNPq, no período de 01/09/2020 a 31/08/2021, na Unesp, Faculdade de Odontologia de Araraquara, sob a supervisão Professor(a) Daniela Leal Zandim-Barcelos, ao desenvolver o projeto intitulado "Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Utilização da Clorina e6 em Biofilmes Monoespécie de Fusobacterium nucleatum e Porphyromonas gingivalis."		
São Paulo, 29 de novembro de 2022		
 Edson Cocchieri Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"		

ANEXO B - CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO CIC

Verifique o código de autenticidade 7407725.5763874.802821.7.51339443280350190983 em <https://www.ever3.com.br/documents>

