UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CAIQUE ANDRADE SANTOS

O derivado de ftalocianina é menos citotóxico e não influencia negativamente a cicatrização *in vitro* de feridas comparado à clorexidina

BAURU
2022

CAIQUE ANDRADE SANTOS

O derivado de ftalocianina é menos citotóxico e não influencia negativamente a cicatrização *in vitro* de feridas comparado à clorexidina

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Periodontia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando

BAURU
2022

Santos, Caique Andrade
O derivado de ftalocianina é menos citotóxico e não influencia negativamente a cicatrização *in vitro* de feridas comparado à clorexidina -- Bauru, 2022.
83 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, ano de defesa (2022).

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

ANOS
FOB-USP
• 1962 - 2022 •

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por
CAÍQUE ANDRADE SANTOS
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 18 de outubro de 2022.

Prof. Dr. **GUILHERME RODRIGUES TEODORO**

Prof. Dr. **FABIANO VIEIRA VILHENA**

Prof.ª Dr.ª **CARLA ANDREOTTI DAMANTE**
FOB-USP

Prof.ª Dr.ª **MARIANA SCHUTZER RAGGHIANTI ZANGRANDO**
Presidente da Banca
FOB - USP

Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à **Deus** e minha **família**, em especial aos meus pais, **Amauri dos Santos** e **Maria do Carmo Andrade Santos**, e meu irmão **Stefan Andrade Santos**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente aos meus pais, **Amauri dos Santos** e **Maria do Carmo Andrade Santos**, pelo apoio e amor incondicional durante todo o mestrado, por serem guias e conselheiros durante as tribulações. Vocês são inspiração, motivo e razão de toda minha dedicação. Ao meu irmão, **Stefan Andrade Santos**, por todo carinho e apoio.

Profa. Dra. Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando, palavras são difíceis para expressar minha gratidão. Obrigado por me aceitar como orientado, por compartilhar seu brilhante conhecimento de forma única e inspiradora.

Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, Profa. Dra. Carla Damante, Prof. Dr. Sebastião Luíz Aguiar Greghi e **Prof. Dra. Samira Salmeron** obrigado pelos ensinamentos e orientações. **Ivânia Komatsu da Costa, Edilaine Lúcio Rodrigues Torrecilha** e **Marcela Maria Pereira** agradeço pelos conselhos e toda dedicação ao Departamento de Periodontia.

Obrigado **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso** e **Adriano Pessôa** pelo auxílio e desenvolvimento da metodologia, além de abrirem as portas do Departamento de Bioquímica para execução do trabalho.

Agradeço aos colegas **pós-graduandos** pela convivência, harmonia e todo auxílio durante o mestrado.

Agradecimento especial as empresas **Golden Technology** e **TRIALS – Oral Health & Technologies** que financiaram e forneceram materiais para realização da pesquisa.

Agradeço meus **amigos** que, mesmo de longe, fizeram parte desse momento especial na minha trajetória.

Por fim, agradeço a **Deus** pelo dom da vida e poder viver intensamente todas as fases desse trabalho.

Caique Andrade Santos

“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida”.

Sigmund Freud

RESUMO

O uso de substâncias químicas auxiliares no pós-operatório precoce de procedimentos cirúrgicos periodontais é recomendado, uma vez que nesse período o paciente apresenta dor e desconforto e a remoção mecânica de biofilme tem potencial risco de trauma na área operada. O uso de enxaguatório com digluconato de clorexidina (CHX) é considerado padrão ouro no controle químico do biofilme supragengival. Contudo, seu uso pode causar distúrbio e alteração no paladar, ulceração na mucosa e manchamento de dentes; além disso, estudos laboratoriais evidenciam grande citotoxicidade do composto. Os derivados de ftalocianinas (PHY) vêm sendo amplamente estudados em literatura devido seus efeitos positivos associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aTFD), apresentando, sobretudo, boa atividade antimicrobiana. Uma classe ainda pouco explorada de PHY é a autoativada, caracterizada por um amplo espectro e ativação na ausência de luz, produtos químicos ou eletricidade, exceto oxigênio molecular. Sendo assim, o objetivo do estudo foi comparar a citotoxicidade *in vitro* de CHX e PHY e avaliar a influência dos compostos na cicatrização experimental. Diferentes concentrações de CHX e PHY (0,0075% - 0,12%) permaneceram em contato por um minuto com fibroblastos NIH 3T3 sendo avaliada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT e cristal violeta (CV); CHX e PHY (0,0075% e 0,12%) também foram avaliadas no ensaio de cicatrização *in vitro*. A PHY apresentou-se menos citotóxica comparada a CHX, a partir dos ensaios de viabilidade celular. A PHY não interferiu na cicatrização experimental, permitindo a migração celular semelhante ao controle positivo nas duas concentrações estudadas de PHY 0,0075% e PHY 0,12%, a medida em que apenas CHX 0,0075% permitiu a migração de células. Em uma análise comparativa, PHY revelou menor citotoxicidade que CHX, sendo as concentrações de PHY 0,0075% e 0,015% atóxicas mesmo em 48 horas de contato com as células. Podemos concluir que a PHY se apresentou menos citotóxica para fibroblastos NIH 3T3 comparado a CHX, através de dois ensaios para avaliação da viabilidade celular (MTT e CV). Além disso, as diferentes concentrações de PHY não interferiram negativamente na cicatrização de feridas experimentais. Já a CHX permitiu o fechamento apenas em concentrações menores.

Palavras-chave: Agente Fotossensibilizante, Clorexidina, Cicatrização

ABSTRACT

The phthalocyanine derivative is less cytotoxic and does not negatively influence in vitro wound healing compared to chlorhexidine

The use of auxiliary chemical substances in the early postoperative period of periodontal surgical procedures is recommended, since during this period the patient presents pain and discomfort and the mechanical removal of biofilm has a potential risk of trauma in the operated area. The use of chlorhexidine digluconate (CHX) mouthwash is considered the gold standard in the chemical control of supragingival biofilm. However, its use can cause disturbance and alteration in taste, ulceration in the mucosa and staining of teeth; in addition, laboratory studies show great cytotoxicity of the compound. Phthalocyanine derivatives (PHY) have been widely studied in the literature due to their positive effects associated with Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), showing, above all, good antimicrobial activity. A still little explored class of PHY is the self-activated one, characterized by a broad spectrum and activation in the absence of light, chemicals or electricity, except molecular oxygen. Therefore, the aim of the study was to compare the in vitro cytotoxicity of CHX and PHY and to evaluate the influence of the compounds on experimental healing. Different concentrations of CHX and PHY (0,0075% - 0,12%) remained in contact for one minute with NIH 3T3 fibroblasts, and cell viability was evaluated by the MTT and crystal violet (CV) assay; CHX and PHY (0,0075% and 0,12%) were also evaluated in the in vitro healing assay. PHY was less cytotoxic compared to CHX, based on cell viability assays. PHY did not interfere with experimental healing, allowing cell migration similar to the positive control at the two concentrations studied of PHY 0,0075% and 0,12% PHY, as only 0,0075% CHX allowed cell migration. In a comparative analysis, PHY showed less cytotoxicity than CHX, with PHY concentrations of 0,0075% and 0,015% being non-toxic even after 48 hours of contact with the cells. We can conclude that PHY was less cytotoxic to NIH 3T3 fibroblasts compared to CHX, through two assays to evaluate cell viability (MTT and CV). Furthermore, the different concentrations of PHY did not interfere negatively in the healing of experimental wounds. CHX, on the other hand, allowed closure only at lower concentrations.

Keywords: Photosensitizing Agents, Chlorhexidine, Wound Healing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural representativa de PHY 28

Figura 2 - Controle Positivo tempo 0h 56

Figura 3 - Controle Positivo tempo 24h 56

Figura 4 - Controle Positivo tempo 48h 57

Figura 5 - Controle Positivo tempo 72h 57

Figura 6 - Grupo CHX 0,0075% tempo 0h 58

Figura 7 - Grupo CHX 0,0075% tempo 24h 58

Figura 8 - Grupo CHX 0,0075% tempo 48h 59

Figura 9 - Grupo CHX 0,0075% tempo 72h 59

Figura 10 - Grupo PHY 0,0075% tempo 0h 60

Figura 11 - Grupo PHY 0,0075% tempo 24h 60

Figura 12 - Grupo PHY 0,0075% tempo 48h 61

Figura 13 - Grupo PHY 0,0075% tempo 72h 61

Figura 14 - Grupo CHX 0,12% tempo 0h 62

Figura 15 - Grupo CHX 0,12% tempo 24h 62

Figura 16 - Grupo CHX 0,12% tempo 48h 63

Figura 17 - Grupo CHX 0,12% tempo 72h 63

Figura 18 - Grupo PHY 0,12% tempo 0h 64

Figura 19 - Grupo PHY 0,12% tempo 24h 64

Figura 20 - Grupo PHY 0,12% tempo 48h 65

Figura 21 - Grupo PHY 0,12% tempo 72h 65

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico representativo do ensaio de MTT no tempo de 1 minuto de contado das células com os grupos experimentais 51

Gráfico 2 - Gráfico representativo no ensaio de MTT do tempo de 24 horas de contado das células com os grupos experimentais 51

Gráfico 3 - Gráfico representativo do ensaio de MTT no tempo de 48 horas de contado das células com o grupo PHY 52

Gráfico 4 - IC_{50} do grupo PHY no tempo de 24h 53

Gráfico 5 - IC_{50} do grupo PHY no tempo de 48h 53

Gráfico 6 - Gráfico representativo do ensaio de Cristal Violeta 54

Gráfico 7 - Gráfico do percentual de fechamento da fenda no ensaio de cicatrização de feridas 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades expressadas pelos Derivados de Ftalocianina (PHY) e sua aplicação em Odontologia 37

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	*American Type Culture Collection*
aTFD	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
ATP	Adenosina Trifosfato
CHX	Digluconato de Clorexidina
CV	Cristal Violeta
DDS	Sistemas Específicos de Liberação de Drogas
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
IC_{50}	50% de Viabilidade Celular
IL-6	Interleucina 6
MMP	Metaloproteinases
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- yl)-2,5- difeniltetrazólio
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PHY	Derivados de Ftalocianinas
RAR	Raspagem e Alisamento Radicular
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SARS-CoV-2	Coronavírus 2
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformante Beta 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 Uso de enxaguatórios em Periodontia 18

2.2 Clorexidina 19

2.2.1 Citotoxicidade da clorexidina e influência na cicatrização 22

2.3 Derivados de ftalocianinas 28

2.3.1 Propriedades das ftalocianinas e sua aplicação em Odontologia 30

2.3.2 Influência dos derivados de ftalocianinas na cicatrização 38

3 PROPOSIÇÃO 43

3.1 Objetivo geral 43

3.2 Objetivos específicos 43

4 MÉTODOS 45

4.1 Cultura de células 45

4.2 Grupos experimentais 45

4.3 Análise de viabilidade celular 46

4.3.1 Ensaio de MTT 46

4.3.2 Ensaio de Cristal Violeta 47

4.4 Ensaio de cicatrização de feridas (*Wound healing assay*) 47

4.5 Análise Estatística 48

5 RESULTADOS 50

5.1 Análise de viabilidade celular 50

5.1.2 Ensaio de MTT 50

5.1.3 Ensaio de cristal violeta 54

5.2 Ensaio de cicatrização de feridas 54

6 DISCUSSÃO 67

7 CONCLUSÕES 73

REFERÊNCIAS 75

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias químicas auxiliares no tratamento odontológico é comum em muitas áreas de atuação do cirurgião dentista. Em Periodontia, sabe-se que a remoção mecânica do biofilme dentário utilizando escovas convencionais, interdentais e fio dental é essencial para manter a saúde periodontal. Contudo, existem eventuais situações de maior dificuldade de uso de meios mecânicos. No pós-operatório precoce, entre 7 a 10 dias após o procedimento cirúrgico periodontal, além de ser um momento no qual o paciente pode apresentar dor e desconforto, a remoção mecânica de biofilme tem potencial risco de trauma na região operada, dessa forma, o controle químico do biofilme supragengival é mandatório (GKATZONIS *et al*., 2018).

Dentre as substâncias químicas disponíveis, o digluconato de clorexidina (CHX) é o mais prescrito após cirurgias periodontais, por ser um agente antisséptico de amplo espectro e proporcionar um bom controle de biofilme e inflamação gengival. Os estudos demonstram que esse agente químico apresenta efeito antibacteriano, antifúngico e antiviral, além da característica de liberação lenta, evidenciando atividade antimicrobiana por até 12 horas (BRECX *et al*., 1990; OVERHOLSER *et a*l., 1990; CHARLES *et al*., 2004; LÖE; SCHIØTT,1970). No entanto, a CHX pode apresentar efeitos adversos pelo seu uso continuado, como pigmentação extrínseca dos dentes, distúrbio ou alteração do paladar, sensação geral de queimação, queimação na língua e sintomas na mucosa oral, tal qual dor, irritação, descamação leve e ulceração da mucosa (FLÖTRA *et al*., 1971; RICHARDS, 2017). Ademais, estudos laboratoriais certificam concentrações citotóxicas de CHX para células, podendo inibir proliferação de fibroblastos, redução da síntese de colágeno e influenciando negativamente a migração celular (DOGAN *et al*, 2003; BOISNIC *et al*, 2006; LIU *et al.*, 2018; BERNER *et al*., 2020).

Outros tipos de agentes vêm sendo desenvolvidos visando os mesmos efeitos da CHX, porém com reduzidos efeitos colaterais. Dentre esses, agentes que liberam oxigênio têm ganhado destaque por apresentar além do efeito antibiótico, um significativo potencial para o padrão de cicatrização (EISENBUD, 2012). O oxigênio auxilia no metabolismo bioquímico e função celular, e tem papel no combate à

infecção, facilitando também a cascata de cicatrização de feridas. Existe forte evidência científica para os tratamentos com oxigênio na profilaxia contra infecção e para facilitar o fechamento de feridas, incluindo tratamentos tópicos com oxigênio (EISENBUD, 2012). O estado de oxigenação da ferida é um dos principais determinantes dos resultados da cicatrização. Sendo assim, abordagens terapêuticas visando vias de sinalização de oxigênio são promissoras (SEN, 2009).

As ftalocianinas ou derivados de ftalocianinas (PHY) são compostos químicos que podem estar associados a outros elementos como cobalto, alumínio, zinco ou ferro que são amplamente estudados devido aos efeitos positivos na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD), sendo utilizados como corantes fotossensibilizantes. A aTFD é baseada na associação de oxigênio, uma fonte de luz e um fotossensibilizador que, juntos, produzem agentes letais para as células microbianas (NYAMU *et al*., 2018). A molécula de PHY é ativada pela absorção da luz visível, desencadeando reações eletrônicas a partir do seu estado excitado, além de apresentar uma boa profundidade de penetração no tecido, levando a uma melhor resposta da aTFD (YOUNG *et al*., 2016). Outra classe de PHY pouco explorada na literatura são as autoativadas, caracterizadas por um amplo espectro de ação baseado na autoativação e formação contínua e localizada de oxigênio reativo, na ausência de luz, produtos químicos ou eletricidade, exceto oxigênio molecular (SANTOS *et al.*, 2020; TEODORO *et al.*, 2020).

Considerando os efeitos adversos da CHX e os estudos promissores das PHY expostos anteriormente, o objetivo desse trabalho *in vitro* foi comparar a citotoxicidade da Clorexidina e do derivado de Ftalocianina por meio do ensaio de viabilidade celular (MTT e Cristal Violeta), além de avaliar a possível interferência dos compostos na migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas após os períodos experimentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esse capitulo tem como objetivo abordar trabalhos científicos relevantes para a compreensão da metodologia e justificativa do presente estudo. Dessa forma, abordará o uso de enxaguatórios em Periodontia, o digluconato de clorexidina e apresentação dos derivados de ftalocianinas, bem como os estudos desenvolvidos com essa molécula orgânica e seu potencial de aplicabilidade em Odontologia.

2.1 Uso de enxaguatórios em Periodontia

O biofilme dental é o fator etiológico mais importante para desenvolvimento de doenças bucais, como cárie dentária e doenças que afetam o periodonto. A formação de biofilme pode ser controlada pelo paciente seguindo práticas de higiene oral, com escovas manuais/elétricas e fio/fita dental, ou por meio de tratamentos mecânicos realizados em consultório. No entanto, em casos específicos, como a presença de bolsas periodontais profundas e áreas de lesão de furca de difícil acesso, após cirurgia periodontal, as abordagens mecânicas podem não ser suficientes para eliminar os patógenos, além de oferecerem potencial risco de trauma na região operada (YAYLI *et al.*, 2021). Além disso, a cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que consiste em várias fases sobrepostas e é influenciada por muitos fatores. O atraso desta aumenta o risco de infecções, muitas vezes de difícil tratamento, podendo levar a comprometimentos sistêmicos (BERNER *et al*., 2020). Dessa forma, foi sugerido o uso de agentes antimicrobianos adjuvantes a remoção mecânica de biofilme. Esses agentes antimicrobianos incluem antibióticos locais ou sistêmicos e soluções antissépticas com efeitos antibacterianos (YAYLI *et al*., 2021; BERNER *et al*., 2020).

Sabendo que a cavidade oral abriga uma grande variedade de micro-organismos, em situações pontuais, o controle de seu crescimento ou eliminação requer o uso de enxaguatórios (BERNER *et al*., 2020). Os antissépticos orais são geralmente utilizados para reduzir a carga microbiana na cavidade oral e controlar o mau hálito. Devido à sua atividade antimicrobiana, também são recomendados para controle de placa supragengival e tratamento de gengivite, antes de procedimentos

cirúrgicos orais e periodontais e durante a fase de manutenção pós-operatória. Eles geralmente contêm digluconato de clorexidina, etanol, óleos essenciais e detergentes como ingredientes ativos padrão.

Além de ter atividade antimicrobiana, uma solução antisséptica segura não deve danificar os tecidos, desencadear alguma condição alérgica e ser absorvida pela mucosa oral, mesmo durante uso prolongado. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são amplamente utilizados para analisar a biocompatibilidade de diferentes materiais, devido às suas vantagens econômicas e repetibilidade das medidas como padrões de segurança biológica (SCHMALZ, 1997).

Os agentes antissépticos passam por testes de toxicidade antes de entrar no mercado, mas vários efeitos colaterais clinicamente observáveis podem ser detectados após uso prolongado (TARTAGLIA *et al*., 2019). Alguns dos ingredientes usados nos agentes podem causar irritação nos tecidos e estudos relataram resultados conflitantes em relação aos efeitos dos antissépticos na cicatrização de feridas (BERNER *et al*., 2020; DOGAN *et al*., 2003). Esses achados demonstram que enxaguatórios orais podem apresentar toxicidade, tanto o uso frequente e indiscriminado pelos pacientes quanto a prescrição pelo dentista de certos agentes precisam ser cuidadosamente reavaliados.

Os enxaguatórios com clorexidina na formulação são amplamente prescritos, podendo ser utilizados para melhorar o controle da placa durante a fase inicial da terapia e após a cirurgia periodontal. Os enxaguatórios com óleos essenciais são eficazes como irrigantes, têm menos efeitos colaterais e estão disponíveis para venda livre. O uso de enxaguatórios orais cosméticos não deve ocorrer em substituição aos meios mecânicos comprovados de remoção da placa.

2.2 Clorexidina

Há mais de 50 anos o digluconato de clorexidina (CHX) é estudado em Odontologia e reconhecido por ser um agente anti-placa e anti-inflamatório, além de ser considerado padrão ouro no controle químico de placa (LÖE; SCHIØTT,1970). O CHX é um antisséptico de amplo espectro de ação apresentando efeito antibacteriano,

antifúngico e antiviral. Além disso, tem característica de liberação lenta e substantividade, podendo expressar atividade antimicrobiana por até doze horas. A substantividade permite que o CHX permaneça retido no local de ação ativo, na superfície dos dentes, gengiva e mucosa, sendo liberado lentamente. Dessa forma, impede que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar. No tratamento de infecções causadas por biofilme, a substantividade do agente antimicrobiano é essencial, uma vez que é necessário um certo tempo de contato para inibir ou eliminar micro-organismos (HORTENSE *et al.*, 2010).

A clorexidina é retida sobre a hidroxiapatita do esmalte dos dentes, proteínas salivares e biofilme das superfícies orais, sendo gradualmente liberada por difusão e a concentração na boca é mantida em um nível suficiente para criar um meio bacteriostático por um período prolongado de tempo. Dessa forma, CHX em baixa concentração é considerado bacteriostático e em alta concentração, bactericida.

Um estudo da década de 60 elucidou o mecanismo de ação da clorexidina (HUGO; LONGWORTH, 1964). Os pesquisadores demonstraram que a molécula catiônica da clorexidina interage com o micro-organismo, possivelmente em decorrência da adsorção à parede celular aniônica, alterando as estruturas da superfície e aumentando a permeabilidade da membrana celular bacteriana, facilitando a entrada do ativo no citoplasma. O equilíbrio é perdido ocorrendo precipitação dos constituintes citoplasmáticos, impedindo a reparação da membrana celular, causando a morte do micro-organismo.

Essas características conferem efetividade do CHX no controle do biofilme. O CHX retido na cavidade oral após o bochecho, produz uma inibição no desenvolvimento de micro-organismos pelo seu efeito bactericida e bacteriostático. Aliado ao controle mecânico nas áreas periféricas a região operada, o controle químico com o antisséptico permite manutenção de um ambiente mais favorável para cicatrização após procedimentos cirúrgicos periodontais. Na presença de quantidades mínimas de biofilme, as feridas periodontais cicatrizam mais rapidamente e com menos complicações do que quando se acumulam grandes quantidades de biofilme. Sendo assim, a remoção pós-cirúrgica de biofilmes recém-formados desempenha um papel crucial na fase inicial de cicatrização e em resultados periodontais com sucesso

a longo prazo (WESTFELT, 1996).

A atividade antimicrobiana do CHX depende da suscetibilidade dos micro-organismos, sendo que os gram-positivos apresentam alta suscetibilidade em relação aos gram-negativos. A clorexidina tem se mostrado um efetivo agente antimicrobiano no tratamento de gengivite, dispersor da placa já formada e inibidor da recolonização da placa bacteriana. Essa ação pode ser atribuída a uma redução no número de bactérias na saliva, evitando-se o desencadear do quadro inflamatório da gengivite (SCHIÖSTT; BRINER; LÖUE, 1976).

Aliado a esses atributos favoráveis, até o momento, o CHX apresentou baixa evidência de toxicidade sistêmica em seres humanos, além de não produzir qualquer resistência considerável dos micro-organismos orais. Ademais, a molécula demonstra-se estável e não é associada a quaisquer alterações teratogênicas (NEWMAN *et al*., 2016).

São muitas indicações para o uso deste antisséptico sugeridas em literatura. Bochechos duas vezes ao dia com solução de clorexidina a 0,12% representam um tratamento adjuvante muito efetivo para reduzir a formação de biofilme, mesmo quando a escovação não é efetuada em condições específicas. A ação terapêutica do CHX tem papel fundamental na redução de doenças e agravos à saúde bucal, como no período de cicatrização após cirurgias periodontais. Previamente ao procedimento cirúrgico, CHX é utilizado para antissepsia extra e intraoral. É válido destacar que para um efeito ótimo da CHX, ela deve ser utilizada em conjunto e em associação com a raspagem e alisamento radicular em determinados casos. CHX não penetra na área subgengival e é prontamente inativada por exsudatos bacterianos. Por isso, a efetividade dos bochechos depende de desbridamento mecânico completo e simultâneo. (NEWMAN *et al*., 2016)

Extensas pesquisas demonstraram os efeitos clínicos benéficos do controle químico de formação de placa supragengival em qualquer tipo de cirurgia, sendo CHX considerado o padrão-ouro para esse propósito. A importância do CHX nesse momento especifico é essencial a fim de evitar trauma da escova dental e consequente desconforto e sensibilidade percebidos pelo paciente na área cirúrgica (SIJARI *et al.*, 2019).

Quando administrado por via oral, o CHX é livre de toxicidade sistêmica e resistência microbiana. No entanto, CHX pode apresentar efeitos adversos, principalmente pelo seu uso continuado, como alteração na coloração nos elementos dentários, restaurações, próteses e língua, distúrbio e alteração do paladar, sensação geral de queimação, queimação na língua e sintomas na mucosa oral, tal qual dor, irritação, descamação leve e ulceração da mucosa (FLÖTRA *et al*., 1971; RICHARDS, 2017; PEGORARO *et al*., 2014).

2.2.1 Citotoxicidade da clorexidina e influência na cicatrização

Apresentando uma toxicidade sistêmica baixa aliada a eficiência antisséptica, o CHX é comumente prescrito após cirurgias orais. No entanto, a literatura é vasta em estudos que revelam efeito citotóxico de CHX contra a diversas células, como: fibroblastos gengivais humanos (MADHUSUDANAN; RENJITH, 2020; BERNER *et al*., 2020; COELHO *et al*., 2019; DOGAN *et al*., 2003; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; LIU *et al*., 2018; MARIOTTI; RUMPF, 1999; PUCHER; DANIEL,1992; SAWADA *et al*., 2015; SCHMIDT *et al*., 2015; SUKUMARAN; VADAKKEKUTTICAL; KANAKATH, 2020; THOMAS *et al*., 2009; TSOUROUNAKIS *et al*., 2012; WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA *et al*., 2016; YAYLI *et al*., 2021), fibroblastos animais (GIANNELLI *et al*., 2008; MÜLLER; KRAMER, 2008; REDDING; BOOTH, 1991), células ósseas (LIU *et al*., 2018; GIANNELLI *et al*., 2008; CABRAL; FERNANDES, 2007), células do ligamento periodontal (CHANG *et al*., 2001; OK; ADANIR; HAKKI, 2015; TSOUROUNAKIS *et al*., 2012), células neuronais (DOAN *et al*., 2012), células de Schwann (DOAN *et al*., 2012), células endoteliais (GIANNELLI *et al*., 2008), epiteliais (SCHMIDT *et al*., 2015) e mioblastos (LIU *et al*., 2018). Essa condição justifica a busca de soluções alternativas que sejam capazes de oferecer benefícios clínicos semelhantes ao CHX, contudo, com menos efeitos citotóxicos e adversos ao organismo.

A citotoxicidade de concentrações de CHX comumente recomendadas após procedimentos cirúrgicos periodontais, 0,12% e 0,2%, foram avaliadas em fibroblastos (MADHUSUDANAN; RENJITH, 2020). A partir do ensaio de viabilidade celular, apenas 24,9% e 24,56% das células apresentaram-se viáveis após 24 h de contato de CHX 0,12% e CHX 0,2%, respectivamente. Além disso, a microscopia revelou que

as células tratadas com CHX apresentaram alterações morfológicas, como encolhimento celular, núcleos condensados, bolhas de membrana e corpos apoptóticos. Berner e colaboradores (BERNER *et al*., 2020) investigaram concentrações de CHX que em 24 horas de contato com fibroblastos humanos apresentaram 50%, 25% e 2% de inibição de crescimento, essa última também definida como concentração não-citotóxica de CHX; os resultados revelaram que CHX a 0,00241%, 0,00156% e 0,00039% inibem, respectivamente, 50%, 25% e 2% do crescimento celular. O estudo inclusive realizou o ensaio de cicatrização de feridas, no qual uma fenda é criada em microplacas de cultura celular e tratadas com as soluções, dessa forma, é comparada a migração celular entre controle e teste durante 48 horas; a concentração de CHX que permitiu a migração celular semelhante ao grupo controle foi a de 0,00039%. O estudo ainda verificou que essa concentração baixa de CHX induziu níveis de liberação de IL-6 e TGF-β1 semelhantes ao grupo controle.

Com finalidade de observar o comportamento de concentrações de CHX (0,002%, 0,02%, 0,2% e 2%) no ensaio de cicatrização de feridas, Liu e colaboradores (LIU *et al*., 2018) mantiveram CHX em contato por 1, 2 e 3 minutos com fibroblastos, mioblastos e osteoblastos. Todas as três células expostas a diluições de CHX ≥ 0,02% em todos os tempos tiveram taxas de sobrevivência inferiores a 6% em relação ao controle positivo. Todas as células expostas à diluição de CHX de 0,002% apresentaram taxas de sobrevivência significativamente menores em relação ao controle, com exceção da exposição de 1 minuto aos fibroblastos, que apresentou 96,4% de sobrevivência celular. O fechamento da ferida experimental ocorreu apenas em CHX 0,002% nos fibroblastos com 1 e 2 min de contato e nos osteoblastos com 1 min de contato. As células expostas a diluições de CHX ≥ 0,02% apresentaram fendas que permaneceram abertas indefinidamente. Na investigação de Thomas e colaboradores (THOMAS *et al*., 2009), apenas concentrações inferiores de CHX (0,0016% e 0,008%) permitiram a migração de fibroblastos, notando ainda que CHX 0,0032% inibe quase 100% da proliferação celular *in vitro*.

A nível celular, um estudo da década de 90 verificou que CHX 0,002% apresenta citotoxicidade mínima ao fibroblasto humano, mas é capaz de suprimir quase completamente a divisão celular (PUCHER *et al*., 1992). A síntese proteica total foi suprimida pela CHX e os autores concluíram que CHX é altamente citotóxica para

as células *in vitro*, além de várias funções celulares, como proliferação e síntese de proteínas serem afetadas em diferentes graus. Wyganowska-Swiatkowska e colaboradores, similarmente, verificaram que CHX 0,002% não interfere na proliferação de fibroblastos, contudo, concentrações de CHX ≥ 0,04% inibem a proliferação e afetam a morfologia celular (WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA *et al*., 2016). Giannelli e colaboradores (GIANNELLI *et al*., 2008) observaram que CHX afetou a viabilidade celular de maneira dose e tempo-dependente, particularmente em osteoblastos. Seu efeito citotóxico consistiu na indução de morte celular apoptótica e autofágica/necrótica e envolveu distúrbios da função mitocondrial, aumento de íon cálcio intracelular e estresse oxidativo. Um outro estudo com fibroblastos evidenciou que concentrações de CHX maiores que 0,001% tem efeito na produção de ATP (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001). Em 24 h de contato das células, mesmo com CHX 0,0001% ocorreu diminuição do ATP e em concentrações ≥ 0,02% têm-se perda total de ATP. CHX exerceu, ainda, um efeito inibitório dependente da concentração na síntese de DNA a partir de concentrações baixas (0,0001%).

A concentração de CHX 0,12% é citotóxica para células do ligamento periodontal (TSOUROUNAKIS *et al*., 2012). Esse trabalho elucidou que CHX 0,0018% apresenta citotoxicidade para célula, sendo CHX 0,0024% capaz de reduzir mais de metade da viabilidade celular. CHX 0,003% resultou em quase morte completa de células, além de inibir a capacidade de migração *in vitro*. Outros autores corroboram que CHX é citotóxico e inibiu a síntese de proteínas das células do ligamento periodontal, apresentando efeito inibitório na atividade mitocondrial (CHANG *et al*., 2001; OK; ADANIR; HAKKI, 2015).

As células ósseas também apresentam sensibilidade a diferentes concentrações de CHX. No trabalho de Cabral e Fernandes (CABRAL; FERNANDES, 2007) foi observado que osteoblastos de alvéolos humanos em cultura não sobrevivem a um tempo curto de contato (2 minutos) com CHX 0,12% e CHX 0,2%, afetando principalmente o crescimento celular. Os osteoblastos demonstraram maior interferência na viabilidade celular que células endoteliais e fibroblastos frente a concentrações diferentes de CHX no estudo de Giannelli e colaboradores (GIANNELLI *et al*., 2008). Células neuronais e células de Schwann sofrem deformações em contado com CHX, tornando-se arredondadas e enrugadas, sendo CHX 0,00801% e CHX 0,0021% capazes de reduzir em 50% a viabilidade celular (DOAN *et al*., 2012).

Com o objetivo de avaliar o potencial de cicatrização de feridas da mucosa bucal, Boisnic e colaboradores (BOISNIC *et al.*, 2006) compararam o uso de enxaguatório CHX 0,10% com álcool e CHX 0,12% sem álcool, frente a uma cultura de células coletadas da mucosa oral normal de pacientes submetidos a exodontia de terceiros molares. O trabalho realizou uma avaliação imuno-histoquímica do potencial mitótico das células epiteliais e uma avaliação bioquímica da capacidade de síntese de colágeno dos fibroblastos da mucosa gengival. CHX com álcool não alterou o potencial de proliferação epitelial e de síntese de colágeno cultivado em condições de sobrevivência. Os resultados revelaram uma diferença significativa entre os dois enxaguatórios bucais para cada um dos parâmetros estudados, sendo mais favoráveis para CHX contendo álcool. Dessa forma, o estudo pode concluir a partir da metodologia utilizada que a presença de álcool em bochechos contendo CHX 0,10% não teve efeitos deletérios na capacidade de cicatrização, pelo contrário, ajudando a estimular a cicatrização de feridas.

O estudo de Hamp e col. da década de 70 (HAMP; ROSLING; LINDHE, 1975) em animais observou que o tratamento com CHX em pós operatório proporciona uma cicatrização de feridas com menores sinais de inflamação. Os animais (cinco cachorros) receberam um preparo prévio ao estudo, com escovação por quatro semanas, apresentando aspecto saudável de gengiva. Após duas semanas sem higiene oral, os animais foram submetidos a gengivectomia bilateral. Um lado foi tratado com solução de CHX 0,2% duas vezes ao dia e o outro com solução salina por 42 dias. Amostras de gengivas foram coletadas 2, 4, 7, 14, 28 e 42 dias após o procedimento cirúrgico para análise histométrica. Ao final do estudo, observou-se que a área tratada com solução salina apresentou características de inflamação crônica além de acúmulo de placa, enquanto o lado tratado com CHX 0,2% regenerou-se com níveis menores de infiltrado inflamatório e a superfície dentária livre de placa. Os resultados demonstraram que a perda de inserção periodontal em cães pode ocorrer durante a cicatrização após a cirurgia periodontal, a menos que os acúmulos de placa sejam removidos e a formação de placa seja evitada. O resultado enfatiza a importância de manter a área cirúrgica livre de placa durante o período de cicatrização após a cirurgia periodontal, além da segurança do uso tópico de CHX.

Com base nesse achado, um ano após, Langebaek e Bay (LANGEBAEK; BAY, 1976) investigaram o efeito de CHX 0,2% no acúmulo de placa e na cicatrização após

gengivectomia realizada em pacientes com bolsas maiores que 5 mm em pelo menos duas áreas da boca persistentes após preparo inicial com RAR e instrução de higiene oral. Para a avaliação, foram coletados o exsudato gengival, além do índice de placa e índice de inflamação gengival na área cirúrgica comparada a área contralateral imediatamente após o procedimento e após 7, 14 e 21 dias. Vale ressaltar que os pacientes ficaram com cimento cirúrgico na área operada nos primeiros 14 dias. Enquanto o paciente esteve com o cimento cirúrgico, o índice de placa na área operada não apresentou diferença entre o grupo controle (bochecho placebo) e o teste (CHX 0,2%). Contudo, após a remoção do cimento cirúrgico, ocorreu um aumento no índice de placa no grupo controle e no teste continuou diminuindo. Além disso, a cicatrização após a retirada do curativo foi promovida quando CHX foi aplicado. Dessa forma, o estudo concluiu que complementar os procedimentos de higiene bucal de pacientes periodontais tratados cirurgicamente com CHX duas vezes ao dia a partir do dia em que o curativo periodontal é removido pode ser aconselhável.

O uso de CHX em feridas de 5 mm de diâmetro no centro do palato de ratos foi investigado em literatura (KOZLOVSKY *et al*., 2007; BASSETTI; KALLENBERGER, 1980). Agentes antimicrobianos foram comparados com solução salina (controle) aplicados uma vez ao dia na área por 21 dias (KOZLOVSKY *et al*., 2007). A área da ferida foi medida por fotografias e a epitelização da ferida foi determinada histologicamente. O gel de CHX 1% obteve uma taxa de epitelização da ferida superior aos outros antissépticos e ao grupo controle. No final do período do estudo, o defeito tratado com esse antimicrobiano cicatrizou quase completamente com mínima irregularidade do tecido residual. Concluiu-se que os agentes antimicrobianos testados quando aplicados em uma ferida excisional com deficiência de tecido epitelial e conjuntivo não apresentaram um efeito negativo na taxa de fechamento da ferida. Bassetti e Kallenberger (BASSETTI; KALLENBERGER, 1980) investigaram a influência de CHX na cicatrização de feridas mucosas-ósseas abertas padronizadas no palato de ratos. Em grupos de teste, a lavagem foi realizada duas vezes ao dia por 30 segundos com CHX a 0,1, 0,2 e 0,5%, solução de Ringer (solução salina) e grupo controle (sem lavagem). Com sete dias de pós-operatório, a cicatrização da ferida foi avaliada clinicamente e histomorfometricamente. Clinicamente ficou evidente que a cicatrização da ferida foi melhor nos animais que enxaguaram com solução de Ringer e pior naqueles que enxaguaram com CHX 0,5%. O aumento da concentração de

CHX causou um atraso na cicatrização da ferida, que resultou em diferenças significativas negativas, inclusive em relação ao controle sem enxágue e CHX 0,5%. Os autores concluíram que altas concentrações de CHX podem, após cirurgias orais, especialmente aquelas em que o osso é exposto, resultar em atraso e distúrbio na cicatrização de feridas.

Clinicamente, CHX 0,12% com álcool ou não na formulação foi testada após cirurgia periodontal não regenerativa e comparou-se a eficácia no controle da placa e na cicatrização precoce de feridas (GKATZONIS *et al*., 2018). Os pacientes do estudo foram submetidos ao uso de CHX por 14 dias após a cirurgia periodontal. Nos dias 7 e 14, os índices de placa e cicatrização precoce de feridas foram registrados. Além disso, no dia 14, a contagem de bactérias foi estimada. Na primeira semana, nenhuma diferença foi observada; no dia 14, o grupo CHX com álcool demonstrou o menor valor de índice de placa e número de bactérias comparadas a CHX sem álcool. Ademais, a cicatrização nesse período foi melhor no grupo CHX com álcool. Assim, concluiu-se que a presença de álcool pode aumentar a eficácia de CHX na cicatrização precoce de feridas, além de ser mais efetiva no controle de placa na ausência de higiene oral mecânica. Outro estudo de metodologia semelhante avaliou o efeito de CHX 0,12% e enxaguatórios bucais contendo óleos essenciais na cicatrização de feridas orais após cirurgia periodontal à retalho (KATSAROS *et al*., 2020). O índice de placa foi significantemente menor no grupo CHX comparado ao controle positivo (bochecho com água) e a análise de epitelização da ferida demonstrou que a cicatrização ocorreu por segunda intenção na primeira semana de pós operatório. O uso de colutórios contendo CHX não parece retardar a cicatrização de feridas. A diluição desse enxaguante bucal comercial pode apresentar uma abordagem para redução dos efeitos adversos associados ao seu uso, mantendo suas propriedades antibacterianas.

Ainda com toda a evidência apresentada de citotoxicidade de CHX, clinicamente o enxaguatório é usado e seus benefícios no controle de placa e cicatrização de feridas após procedimentos cirúrgicos periodontais são notórios. No entanto, é difícil comparar todos os resultados publicados, pois se referem aos diferentes bochechos comerciais contendo CHX, cada um contendo diferentes concentrações desse agente químico ativo e formulações que podem se diferenciar,

alguns podendo conter álcool, o que pode influenciar na proliferação e morfologia das células.

2.3 Derivados de ftalocianinas

Os derivados de Ftalocianinas (PHY) são um grupo promissor de fotossensibilizadores de segunda geração para a terapia fotodinâmica (TFD). Do ponto de vista químico, eles compreendem compostos orgânicos cuja estrutura inclui um anel formado por oito átomos de carbono e oito átomos de nitrogênio unidos por ligações duplas conjugadas (CORBI *et al*., 2018) (Figura 1). O PHY possui propriedades físicas e químicas excepcionais, permitindo que muitos elementos sejam incluídos em sua estrutura em comparação a outros fotossensibilizadores, como o cobalto, alumínio, zinco ou ferro. Sua flexibilidade química possibilita a fixação de diferentes substituintes na posição periférica e permite que ele tenha muitos usos (NYAMU *et al*., 2018).

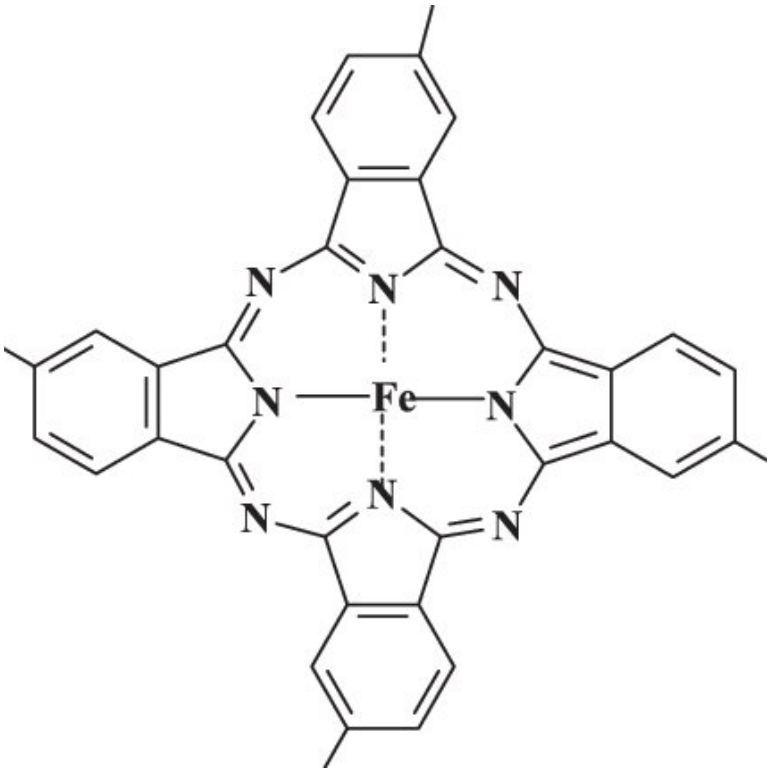

Figura 1 - Fórmula estrutural representativa de PHY

REF: CHAVES, J. A. P. *et al*. Eletrocatálise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina tetracarboxilada de ferro. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 9-20, abr. 2003

As propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, refletindo diretamente no tempo de vida do estado excitado das PHY (CORBI *et al*., 2018). Após sua irradiação, são geradas maiores quantidades de oxigênio singleto comparados aos outros fotossensibilizadores conhecidos, como o azul de metileno e toluidina, e essa propriedade permite PHY permanecer no estado excitado por um período mais longo. Além disso, são mais resistentes à degradação química ou fotoquímica (RYSKOVA *et al*., 2013).

As PHY são compostos mais eficazes na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a ativação da luz e têm menor capacidade de manchar as estruturas dentárias em comparação com as moléculas tradicionais de fenotiazina (LONGO *et al*., 2012). Apesar dessas propriedades positivas, a maioria das PHY são compostos hidrofóbicos fortes que tendem a formar um complexo agregado inativo em ambientes hidrofílicos e formas monoméricas solubilizadas funcionais em soluções hidrofóbicas, podendo diminuir a produção de ROS. Para superar esses obstáculos, as moléculas de PHY podem ser associadas a sistemas específicos de liberação de drogas (DDS) que contêm compartimentos hidrofóbicos úteis para solubilizar os compostos de ftalocianina e manter a solubilidade do DDS nas soluções hidrofílicas, ou mesmo associar com solventes orgânicos (RIBEIRO *et al*., 2013; LONGO *et al*., 2012; CORBI *et al*., 2018).

Os compostos de ftalocianina têm várias aplicações na biotecnologia e na indústria de saúde. Devido às suas excelentes propriedades fotoquímicas, fotofísicas, fotobiológicas, além de sua alta atividade fotodinâmica, PHY são fáceis de sintetizar, têm eliminação rápida com efeitos adversos mínimos, sendo aplicados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e medicinais com objetivo de aplicações comerciais e industriais, e estão comercialmente disponíveis (RIBEIRO *et al*., 2013).

Em literatura, PHY são encontradas amplamente nos estudos de TFD, sobretudo na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD). A aTFD é baseada no princípio de que um corante, como fotossensibilizador, se liga às células alvo e é ativado por luz de comprimento de onda apropriado (LULIC *et al*., 2009), geralmente, a região de absorção de luz das PHY mais adequada está entre 600 e 800 nm. Ao alterar o estado energético das moléculas do fotossensibilizador resulta-se na produção de ROS, radicais livres de oxigénio singleto, que são tóxicos para a célula,

destruindo a membrana, as mitocôndrias ou os núcleos, promovendo dano e morte celular, mesmo de micro-organismos. PHY apresentam boa seletividade, baixa fototoxicidade, permitem penetração tecidual efetiva e são resistentes à degradação química ou fotoquímica (TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018; CARMELLO *et al*., 2016).

Uma classe pouco explorada em literatura são os PHY que não estão associadas a aTFD. O denominado derivado de ftalocianina autoativada é caracterizado pelo amplo espectro de ação baseado na autoativação e na formação contínua e localizada de oxigênio reativo, sem necessidade de ativação externa por luz, produtos químicos ou eletricidade, exceto a presença de oxigênio molecular. Os estudos avaliaram, sobretudo, sua atividade virucida contra a síndrome respiratória aguda grave pelo coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (SANTOS, C. *et al*., 2021), sem causar efeitos citotóxicos (TEODORO *et al*., 2020; SANTOS, P. *et al*., 2021) para células humanas quando incluído em formulações de higiene bucal. Além disso, a aplicação de um bochecho com PHY como adjuvante contra a doença causada pelo coronavírus-2019 (COVID-19) demonstrou uma melhora rápida dos sintomas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados sem efeitos colaterais (SANTOS, P. *et al*., 2021; ORCINA; SANTOS, 2021). Outros estudos avaliaram o potencial antimicrobiano dessa classe de PHY e seu uso adjuvante na terapia periodontal de suporte (SANTOS *et al*., 2020; SANTOS; ZANGRANDO; VILHENA, 2021).

2.3.1 Propriedades das ftalocianinas e sua aplicação em Odontologia

Dentre as propriedades descritas em literatura das PHY, a ação antimicrobiana desse composto químico possui forte evidência científica, tanto na sua forma autoativada como na forma fotoativada. Essa característica é principalmente devido a formação do oxigênio singleto gerado como resultado da reação química com a luz, sendo fototóxico para a célula microbiana. Vale ressaltar que um bom derivado de ftalocianina para ser utilizado como antimicrobiano deve ter alto rendimento quântico para gerar mais oxigênio singleto (NYAMU *et al*., 2018). Este mecanismo de ação é de interesse para área da Periodontia, visto que a fotossensibilização letal de bactérias periodontopatogênicas deve envolver alterações nas membranas e/ou proteínas da membrana plasmática e danos ao DNA mediados pelo oxigênio simples (GARCIA *et al*., 2011).

A propriedade antimicrobiana da PHY é relevante pelo conhecimento cada vez maior da origem infecciosa das doenças orais. A presença de um grande número de micro-organismos e várias espécies bacterianas em contato direto com os tecidos bucais é um fator determinante para a destruição tecidual e o surgimento de doenças (ISLAM *et al*., 2020). Em alguns casos, após as terapias convencionais, os micro-organismos podem permanecer ou recolonizar, necessitando de terapia adicional na tentativa de restaurar a saúde dos tecidos bucais. O uso sistêmico e local de antibióticos associados às terapias convencionais tem mostrado resultados favoráveis, porém, podem apresentar efeitos colaterais e o uso repetido pode levar à resistência bacteriana (CHONDROS *et al*., 2009).

Visto isso, Ryskova e colaboradores em 2013 (RYSKOVA *et al*., 2013), compararam o efeito antimicrobiano de quinze diferentes derivados de ftalocianinas contra bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e leveduras (*Candida albicanas*). Foram avaliados os efeitos de PHY sem luz e nos grupos com irradiação por laser de baixa potência. Os micro-organismos foram incubados previamente por 30 minutos no escuro com o PHY. Os resultados demonstraram que o efeito antibacteriano de todas PHY foi diretamente proporcional à dose de luz utilizada e que a irradiação da bactéria na ausência de PHY não teve influência na viabilidade celular desses micro-organismos, mas em três grupos de PHY houve algum efeito antibacteriano mesmo sem irradiação subsequente. Além disso, oito PHY foram eficazes contra *S. aureus*, quatro contra *E. coli* e dois contra *C. albicans*. Desses, apenas dois são capazes de reduzir a viabilidade das duas bactérias e da levedura efetivamente, podendo ser considerada uma possível alternativa ao uso de antibióticos se for necessário tratamento local.

O estudo laboratorial e clínico de Longo *et al*., 2012 (LONGO *et al*., 2012) teve como objetivo desenvolver um protocolo clínico envolvendo a aplicação de aTFD associada a PHY encapsuladas em lipossomas catiônicos contra bactérias cariogênicas em lesões de cárie. A avaliação *in vitro* demonstrou que PHY foi preferencialmente absorvida pelas células bacterianas em relação às células eucarióticas da polpa dentária, além de ser eficiente na redução da carga microbiana. O estudo clínico determinou uma redução média de 82% do total de bactérias nas cavidades tratadas após a aplicação da aTFD com PHY. Dessa forma, o estudo

concluiu que o protocolo de aTFD com PHY é seguro para aplicação clínica e eficiente na redução da carga bacteriana em lesões de cárie.

A atividade antimicrobiana do PHY foi avaliada contra um importante periodontopatógeno, a bactéria *Porphyromonas gingivalis* (KO *et al*., 2013). O estudo pôde observar que o derivado de zinco de PHY é parcialmente tóxico contra a bactéria, mesmo sem ativação pela luz. Quando associada aos lipossomas, a toxicidade chega próxima a 80%. Nesse mesmo ano (SPESIA; DURANTINI, 2013), a fotoinativação do *Streptococcus mitis* induzida por um derivado de zinco de PHY foi estudada sob diferentes condições experimentais para obter informações sobre os processos fotodinâmicos e os danos celulares no micro-organismo. Observou-se que a atividade fotodinâmica induzida pela PHY produziu alteração nos componentes citoplasmáticos e modificações no envelope celular causando a inativação do *S. mitis*. Associando a PHY a um polímero baseado nos princípios de DDS, Vilsinki e colaboradores em 2015 (VILSINSKI *et al*., 2015), verificaram a fotoinativação de *S.aureus, E. coli* e *C. albicans*. Foi constatado no estudo o efeito antimicrobiano contra *S.aureus* e *C. albicans*, contudo, para a bactéria gram-negativa, *E. coli*, a fotoinativação foi ineficiente, mesmo aumentando a concentração de PHY e o tempo de irradiação de luz.

Outros dois estudos revelam uma ação antifúngica de PHY contra *C. albicans*. Além da forte fotoinativação da levedura, as investigações *in vitro* de Di Palma et al. 2013 (DI PALMA *et al*., 2013) mostraram que PHY se liga rapidamente às células de *C. albicans*, dependendo das concentrações do composto e das densidades celulares. Uma grande quantidade de PHY retida nas células após etapas de lavagem, indicam uma forte interação entre o fotossensibilizador e *C. albicans*. Carmello e colaboradores em 2016 (CARMELLO *et al*., 2016) avaliaram a fotoinativação com PHY em ratos imunossuprimidos inoculados com *C. albicans* para induzir a candidíase oral. A TFD foi realizada na língua com a aplicação dos fotossensibilizadores e luz LED. Vinte e quatro horas e sete dias após os tratamentos, foi realizada avaliação microbiológica por meio da recuperação de *C. albicans* da língua dos animais. O resultado demonstrou que sete dias após o tratamento, todos os animais estavam completamente saudáveis. A avaliação histológica após eutanásia mostrou que a TFD não promoveu efeitos adversos no tecido da língua.

Estudos com a PHY autoativada também demonstraram efeito antimicrobiano. Teodoro e colaboradores em 2020 (TEODORO *et al*., 2020), constataram efeito antimicrobiano de PHY contra *Streptococcus mutans*, além de comparar a citotoxicidade do composto com o fluoreto de sódio nas concentrações encontradas nos produtos para uso odontológico. PHY apresentou baixa citotoxicidade, podendo ser seguramente utilizado em estudos clínicos, corroborando com a avaliação de citotoxicidade de Santos e colaboradores em 2021 (SANTOS, P. *et al*., 2021). Essa PHY, quando incorporada em produtos de uso odontológico, enxaguatório e gel dental, apresentou intensa atividade antimicrobiana frente a diversos micro-organismos: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella sp., Candida albicans*, e *Aspergillus niger*. Com um minuto de contato de ambos os produtos com as bactérias e fungos ocorreu redução de 99,99% na contagem de micro-organismos (ORCINA *et al*., 2021).

Ademais, essa mesma formulação de enxaguatório e gel dental contendo PHY autoativada, apresentou atividade antiviral *in vitro* contra o SARS-CoV-2. O enxaguatório revelou 90% de porcentagem de inativação viral, uma vez que o gel demonstrou 99,99% (SANTOS, C. *et al*., 2021). Um estudo clínico piloto com objetivo de avaliar os efeitos da escovação com dentifrício contendo PHY na redução intraoral da carga viral do SARS-CoV-2 foi desenvolvido por esse grupo de pesquisa. Vinte pacientes diagnosticados com COVID-19 foram selecionados para realizar escovação durante dois minutos com o dentifrício contendo PHY. A avaliação foi realizada pelo RNA viral por meio do teste de RT-PCR coletando saliva não estimulada do participante antes, cinco minutos e trinta minutos após a escovação. Este estudo piloto sugere que a ação da higiene bucal associada a um dentifrício contendo PHY pode ser uma importante ferramenta para redução da carga viral do SARS-CoV2 na cavidade oral, uma vez que constatou diferença estatística significante na redução viral no tempo de trinta minutos comparado ao inicial e cinco minutos após escovação (POLETI *et al*., 2021).

Tais composições para uso intra-oral apresentam ação sinérgica do oxigênio do ar com PHY autoativadas gerando, continuamente, quantidades adequadas e seguras de oxigênio reativo, efetivas contra micro-organismos.

A ação antibiofilme de PHY autoativada foi demonstrada no estudo de Santos e colaboradores em 2020 (SANTOS *et al*., 2020). PHY foi incorporada em formulações odontológicas com e sem fluoreto de sódio e testadas contra biofilmes de *S. mutans*. Os produtos com PHY (enxaguatório e dentifrício) foram comparados com marcas comerciais conhecidas. As soluções permaneceram em contato com o biofilme por cinco, dez e trinta minutos, e após avaliado a biomassa e viabilidade celular. As formulações estudadas reduziram a biomassa e o dentifrício e enxaguatório com PHY foram significantemente melhores na redução da viabilidade celular do biofilme de *S. mutans* em cinco minutos comparados com as marcas comerciais.

O PHY associado a aTFD, similarmente, tem ação antibiofilme. A fotoinativação de um biofilme multiespécies contendo *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* foi avaliada (TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018). A aTFD reduziu a contagem de colônias e a atividade metabólica em 53,7% em relação ao grupo controle, contudo, a biomassa total não apresentou diferença estatística entre os grupos. As análises de microscopia confocal mostraram captação de PHY no biofilme e células mortas foram observadas no biofilme tratado com aTFD. Um outro estudo (RIBEIRO *et al*., 2013) avaliou a aTFD com PHY contra cepas resistentes e não-resistentes a meticilina de *S. aureus*. Apesar da fotoinativação ser eficiente e reduzir o metabolismo de ambas as cepas em cerca de 80%, não foi possível observar atividade antibiofilme em cepas resistentes de S. aureus. Um estudo da década de 90 (WOOD *et al*., 1999), coletou biofilmes orais formados *in vivo* nos participantes da pesquisa para após serem avaliadas os efeitos da aTFD com PHY. A análise microscópica revelou danos consideráveis às bactérias no biofilme, vacuolização do citoplasma e danos à membrana sendo claramente visíveis após aTFD.

A fim de avaliar a influência do derivado de alumínio de PHY associado a TFD na vascularização da gengiva humana, Moraes e colaboradores (MORAES *et al*., 2015), selecionaram pacientes com indicação para exodontia bilateral para o estudo. Sete dias antes do procedimento cirúrgico, os voluntários receberam em um dos lados o tratamento de TFD com PHY e o contralateral foi usado como controle. Imediatamente após exodontia, o tecido gengival foi coletado e fixado em solução de formalina para análise imunohistoquímica e histológica. Os resultados demonstram que a terapia foi bem tolerada pelos pacientes e os efeitos adversos foram de curta duração e reversíveis. A análise histológica permitiu visualizar áreas de edema,

congestão vascular e vascularização intensa em amostras gengivais que receberam a TFD. A avaliação imunohistoquímica verificou que um mediador essencial durante o processo de angiogênese, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), aumentou sua expressão após tratamento.

Sabendo da possibilidade da TFD com PHY exibir atividade imunomoduladora, o mesmo grupo de pesquisa em 2017 (MORAES *et al*., 2017) investigou o perfil de citocinas após a aplicação da TFD em tecidos gengivais de ratos com doença periodontal induzida. Os resultados mostram que PHY sozinho é semelhante ao grupo controle, já os animais tratados com TFD apresentam proliferação de fibroblastos e epitélio juncional associado a moderado infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, além de necrose tecidual e menor expressão de TNF-α comparados a PHY. Dessa forma, o estudo pode concluir que TFD associada ao pode ser útil em terapias, devido aos efeitos imunomoduladores que diminuem a resposta inflamatória e causam destruição tecidual.

Na área da Periodontia, alguns estudos avaliam a possibilidade da PHY como terapia complementar no tratamento periodontal. Corbi e colaboradores (CORBI *et al*., 2020) conduziram um estudo para avaliar a resposta tecidual de ratos com doença periodontal induzida submetidos ao tratamento de aTFD com PHY. Os animais foram divididos em grupo controle, grupo que recebeu o tratamento de raspagem e alisamento radicular (RAR), grupo aTFD com PHY e um grupo que associou a aTFD com PHY e RAR. A doença periodontal foi induzida por quinze dias e no seguinte foi realizado os tratamentos. Os ratos foram sacrificados sete e trinta dias após tratamento para análise histológica. Os resultados revelaram semelhanças entre os grupos, sem diferenças estatísticas, dessa forma a aTFD com PHY não foi efetiva na redução da perda óssea em ratos com doença periodontal induzida.

Corroborando com esse resultado em animais, o estudo clínico de Sena e colaboradores (SENA *et al*., 2019) observaram que a aTFD com PHY adjuvante ao tratamento periodontal não-cirúrgico não melhorou os parâmetros clínicos em pacientes com periodontite crônica. Sítios com doença periodontal foram randomizados e alocados em grupo de RAR sozinha e grupo de RAR associada a aTFD com PHY. A RAR foi realizada em uma única sessão e a aTFD por quinze segundos no sítio do grupo teste. Os parâmetros clínicos periodontais avaliados

foram: índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica antes do tratamento e três meses após a aTFD. O sangramento à sondagem reduziu em ambos os grupos, uma redução na profundidade de sondagem e no nível de inserção clínica para ambos os grupos após 3 meses de terapia foi observada, embora não significativa na comparação intergrupos. Portanto, aTFD com PHY adjuvante a RAR não trouxe benefícios adicionais na redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Silva e colaboradores (SILVA *et al*., 2020), concluindo que a aTFD com PHY não apresentou benefícios estatisticamente comprovados. O tratamento periodontal empregado (RAR + aTFD com PHY) resultou em melhora nos padrões clínicos após 3 e 6 meses de acompanhamento do estudo. Além disso, o estudo avaliou a presença de glutationa, um antioxidante importante do organismo, na saliva antes e após tratamento. Observou-se uma menor necessidade de produção de glutationa, podendo sugerir inicialmente um benefício adicional da PHY no restabelecimento precoce do equilíbrio entre agentes oxidativos e não-oxidativos relacionados ao estresse oxidativo.

Um relato de caso publicado em 2021 por Santos e colaboradores (SANTOS; ZANGRANDO; VILHENA, 2021), sugere um possível benefício no controle de cálculo e mancha de PHY em formulação de dentifrício para uso diário. Um protocolo de escovação três vezes ao dia por seis meses foi estabelecido para um paciente fumante com problema de controle de placa e queixa de manchas recorrentes nos dentes. De acordo com o relato do paciente, confirmado pelo exame clínico dos pesquisadores, a quantidade e a frequência do acúmulo de manchas e cálculos no período de avaliação foram significativamente menores.

Alguns estudos em literatura investigam a presença de PHY em soluções clareadoras evidenciando um potencial benefício do composto no clareamento ótico de dentes (ODILON *et al*., 2018; SHAMEL; AL-ANKILY; BAKR, 2019; VAZ *et al*., 2019; TAO *et al*., 2017; SCHLAFER *et al*., 2021). Bem como o uso do corante como agente para identificação de micro trincas e fratura radiculares (ZOLOTAREVA; FARRAKHOVA; LOSCHENOV, 2018).

Abaixo, encontra-se uma tabela que sintetiza as propriedades dos PHY investigadas em literatura e as áreas de aplicabilidade em Odontologia (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades expressadas pelos Derivados de Ftalocianina (PHY) e sua aplicação em Odontologia

Propriedades	**PHY Ativada por Luz** *in vitro* | *in vivo*		**PHY Autoativada** *in vitro* | *in vivo*	
Antibacteriana	• SPESIA; DURANTINI, 2013 • LONGO *et al*., 2012 • KO *et al*., 2013 • RYSKOVA *et al*., 2013 • TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018 • RIBEIRO *et al*., 2015 • VILSINSKI *et al*., 2015	LONGO *et al*., 2012	• SANTOS *et al*., 2020 • TEODORO *et al*., 2020 • ORCINA *et al*., 2021	
Anti-fúngica	• RYSKOVA *et al*., 2013 • TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018 • DI PALMA *et al*., 2013 • CARMELLO *et al*., 2016 • VILSINSKI *et al*., 2015		• ORCINA *et al*., 2021	
Antibiofilme	• DI PALMA *et al*., 2013 • TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018 • RIBEIRO *et al*., 2015		• SANTOS *et al*., 2020	
Não citotóxica	• LONGO *et al*., 2012		• TEODORO *et al*., 2020 • SANTOS, P. *et al*., 2021	
Terapia complementar (Doença Periodontal)	• CORBI *et al*., 2020 • MORAES *et al*., 2016	MORAES *et al*., 2015 SENA *et al*., 2019 SILVA *et al*., 2020		• SANTOS; ZANGRANDO; VILHENA, 2021
Identificação micro-fraturas	• ZOLOTAREVA; FARRAKHOVA; LOSCHENOV, 2018			
Antiviral			• SANTOS, P. *et al*., 2021 • SANTOS, C. *et al*., 2021	• POLETI *et al*., 2021
Clareamento óptico	• ODILON *et al*., 2018 • SHAMEL; AL-ANKILY; BAKR, 2019 • VAZ *et al*., 2019 • TAO *et al*., 2017	SCHLAFER *et al*., 2021 TAO *et al*., 2017		
Cicatrização de úlceras				• ORCINA; SANTOS, 2021 • ORCINA *et al*., 2021

2.3.2 Influência dos derivados de ftalocianinas na cicatrização

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo que é descrito esquematicamente por três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Durante a primeira fase, células inflamatórias como neutrófilos e monócitos são recrutadas para a ferida para prevenir infecções e limpar a ferida de tecidos mortos e outros corpos estranhos. A segunda etapa é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais, formando um tecido de granulação, e queratinócitos que proliferam e migram para restaurar o epitélio. A última etapa é a remodelação da matriz extracelular que aumenta a resistência à tração da ferida. Em uma ferida aguda, a sequência desses eventos é bem representada e resulta na restauração da integridade anatômica e funcional do tecido (DESMET *et al*., 2015).

O oxigênio desempenha um papel importante nos vários níveis do processo de cicatrização de feridas. Primeiro, durante a fase inflamatória, o oxigênio é usado para produzir ROS para a explosão oxidativa. Durante a fase proliferativa, o oxigênio é utilizado para a fosforilação oxidativa, a fim de produzir energia suficiente para a proliferação de células com alta necessidade metabólica. Sequencialmente, o oxigênio é necessário para a produção e deposição de colágeno maduro pelos fibroblastos durante as fases proliferativas e de remodelação. Consequentemente, a hipóxia prolongada pode ser deletéria em cada fase do processo de cicatrização da ferida: feridas que sofrem de má oxigenação normalmente apresentam uma fase inflamatória sustentada, uma fase proliferativa prolongada e uma baixa resistência à tração da ferida (DESMET *et al*., 2015).

O processo envolvido na TFD não só melhora a atividade mitocondrial, da cadeia respiratória a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), mas também recruta importantes metaloproteinases (MMP), fatores de crescimento e quinase regulada por sinal extracelular que são críticos para diferenciação e proliferação das células da pele (como fibroblastos) e de componentes da matriz extracelular (como elastina e colágeno). A presença de infecção bacteriana deve ser considerada durante a cicatrização de feridas pois podem ser responsáveis pelo insucesso da regeneração tecidual. Dessa forma, a aTFD associada a um fotossensibilizador com uma boa penetração tecidual, como a PHY, tem sua importância na eliminação de micro-

organismos e promoção de proliferação local de tecido sadio, favorecendo o processo de cicatrização (VALLEJO *et al*., 2021).

As PHY vêm ganhando a atenção da comunidade científica como fotossensibilizantes efetivos para cicatrização de feridas cutâneas. Estas moléculas sintéticas permitem sua ativação pela luz e são capazes de atravessar tecidos muito além de 6 mm. Isso é particularmente relevante para o tratamento de infecções locais da pele localizadas profundamente ou no revestimento de órgãos internos usando dispositivos médicos adequados. A característica química da molécula dos derivados de ftalocianina pode melhorar a eficácia fotodinâmica devido à sua alta tendência geral de agregar, quer em soluções orgânicas e aquosas (VALLEJO *et al*., 2021).

A capacidade que a PHY exibe de gerar ROS dá uma contribuição significativa para o processo regenerativo e cicatricial. As ROS são responsáveis por evitar o desenvolvimento de infecções por inativar micro-organismos, como bactérias, mas também por promover a proliferação celular através da ativação de células-tronco que regulam fatores inflamatórios e remodelação do colágeno. A PHY pode atuar sozinha ou combinada com diversos materiais, como polímeros, hidrogéis ou nanotubos, mantendo tanto a fotoinativação microbiana quanto a eficácia dos processos curativos e regenerativos. Dessa forma, PHY se apresenta como um fotossensibilizador efetivo devido a capacidade de gerar ROS quando irradiados na TFD (VALLEJO *et al*., 2021). No entanto, tem sido observado que as ROS podem interagir com diversas estruturas celulares do hospedeiro, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana por diferentes mecanismos e o estresse oxidativo leva à ativação da cascata inflamatória que promove a liberação de várias citocinas pró e anti-inflamatórias, que mobilizam o sistema imunológico do hospedeiro para reverter a situação (CARMELLO *et al*., 2018).

O efeito simbiótico de um fotossensibilizador biocompatível melhora não só a taxa de cicatrização, mas também sua eficiência contra o crescimento de bactérias Gram-negativas (bactérias que são menos afetadas pela aTFD) e consequente formação de biofilme. Além disso, esta abordagem permite a aplicação tópica local, otimizando a presença de PHY na ferida e diminuindo suas taxas de degradação, o que é uma vantagem significativa para os processos regenerativos e de cicatrização da pele (VALLEJO *et al*., 2021).

Dessa maneira, Silva e colaboradores (SILVA *et al*., 2004), investigaram a influência da TFD com PHY no processo de cicatrização de ferida cutânea em ratos. Após a indução da ferida com *punch* de biopsia, os ratos receberam o tratamento com laser e PHY isolados e TFD com PHY, uma vez ao dia por sete dias. A análise histológica revelou que os animais dos grupos testes apresentaram maior quantidade de colágeno e reepitelização em relação aos ratos do grupo controle. Além disso, a remodelação do tecido conjuntivo foi mais evidente no grupo que recebeu o tratamento com TFD associada ao PHY, não causando nenhuma inibição ou dano tecidual durante o processo de cicatrização.

Já com uma pesquisa laboratorial, Primo e colaboradores (PRIMO *et al*., 2012) a partir de um modelo de cultura de células dérmicas e células-tronco mesenquimais da medula óssea, avaliaram a influencia de TFD com PHY em nanoimulsão (sistema de DDS) sobre o processo cicatrização de feridas cirúrgicas. Os resultados mostraram que uma fotobiomodulação adequada usando a combinação de comprimentos de onda na faixa do vermelho e do infravermelho associada a PHY é possível, de modo que pode contribuir para a terapia de cicatrização de feridas e tratamento de outras doenças patológicas da pele. O estudo laboratorial de Jesus e colaboradores (JESUS; SAEKI; TEDESCO, 2016) pôde observar pela análise histológica um aumento de colágeno e elastina, superior a 20%, 14 dias após o tratamento de TFD com PHY. Verificou-se ainda que doses mais altas de luz promovem efeito inibitório, levando à degradação tecidual.

Compreendendo que a descontaminação da ferida favorece o processo de reparo tecidual e a ocorrência generalizada de resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas, métodos alternativos para matar bactérias em feridas estão sendo procurados. Alguns trabalhos em literatura investigam a associação de TFD ao PHY *in vitro* e *in vivo* e seus efeitos contra micro-organismos a fim de beneficiar a cicatrização. Chen e colaboradores (CHEN *et al*., 2016) utilizaram uma PHY de zinco na aTFD e puderam observar os efeitos antimicrobianos promissores na pele infectada por bactérias e o aumento da taxa de cicatrização após o tratamento em um modelo animal. Ademais, o estudo demonstrou que o fotossensibilizador à base de ftalocianina apresenta uma afinidade específica para células bacterianas, uma captação mais eficiente por células bacterianas e efeitos antimicrobianos aprimorados *in vitro*, favorecendo, dessa forma, uma taxa de cicatrização significativamente

aumentada de feridas excisionais infectadas por S. *aureus* em ratos. O tratamento mostrou-se seguro e eficaz.

Sabendo que a cicatrização de feridas é uma resposta organizada e complexa do organismo à lesão tecidual e consequente perda de integridade, diversas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas a fim de obter melhores resultados desse processo, buscando melhorias da cicatrização por fatores que acelerem o processo, reduzam a formação de cicatrizes e induzam a regeneração tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo primário desse estudo foi comparar a citotoxicidade de diferentes concentrações de um derivado de ftalocianina ao digluconato de clorexidina e a influência destes compostos na migração celular de fibroblastos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

a. Avaliar a citotoxicidade dos compostos (PHY e CHX) em diferentes concentrações por meio de dois ensaios de viabilidade celular (MTT e Cristal Violeta);

b. Avaliar a interferência dos compostos na migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas com fibroblastos NIH 3T3.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas células de camundongos, linhagem NIH 3T3 de fibroblastos, provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) CRL-1658 e armazenadas no banco de células da disciplina de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo. As células NIH 3T3 são utilizadas em trabalhos de biocompatibilidade/citotoxicidade desde a década de 60 (JAINCHILL; AARONSON; TODARO, 1969), tendo sido padronizada como uma das primeiras linhagens para testes de novas soluções, materiais, compostos, entre outros. Sendo assim, a escolha dessa linhagem possibilita comparações com inúmeros estudos na literatura, já que são tipos celulares extensamente utilizados com esse objetivo.

A manipulação celular foi realizada em condições estéreis e as culturas celulares foram mantidas em estufa a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2. Os fibroblastos NIH 3T3 foram cultivados em garrafas de 75 cm^2 contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibiótico e antimicótico. As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, na densidade de $5x10^3$ células por poço, sendo contadas com o auxílio da câmera de Neubauer.

4.2 Grupos experimentais

Para determinação das condições experimentais, um estudo piloto prévio foi realizado para analisar a solubilidade dos agentes químicos: Digluconato de Clorexidina (CHX) (Bauru Fórmulas, Bauru, Brasil) e Derivado de Ftalocianina (PHY) (TRIALS - Oral Health & Technologies, Bauru, Brasil), em meio de cultura, com o intuito de definir as concentrações de trabalho que foram utilizadas no decorrer dos ensaios. As concentrações iniciais foram baseadas na concentração comercial de uso clínico da CHX de 0,12% e após o estudo piloto, definidas para os dois grupos

experimentais: Grupo CHX e Grupo PHY, sendo as concentrações dos compostos durantes os experimentos de: 0,0075% (0,075 mg/mL); 0,015% (0,15 mg/mL); 0,03% (0,3 mg/mL); 0,06% (0,6 mg/mL) ou 0,12% (1,2 mg/mL).

4.3 Análise de viabilidade celular

Para análise da viabilidade celular foram realizados os testes de MTT e Cristal violeta. Para o MTT, as células ficaram incubadas nas concentrações dos grupos experimentais dos dois agentes químicos (CHX e PHY) nos tempos de 1 minuto e 24 horas, o Grupo PHY teve a avaliação de viabilidade após período de 48h de tratamento; para o ensaio de Cristal violeta, a célula ficou em contato 1 minuto com os agentes. O experimento dispôs de grupos controles, sendo o controle positivo de viabilidade (DMEM + 10% SFB) e controle negativo de viabilidade (água). Após esse período, as células foram incubadas por mais 24h (37ºC, 5% de CO_2) com DMEM a 10% de SFB para estabilização previamente antes da realização dos ensaios de MTT e Cristal Violeta.

4.3.1 Ensaio de MTT

A análise da viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial das células pelo método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- yl)-2,5-difeniltetrazólio. Este método consiste na conversão do sal tetrazólio em um corante púrpura chamado de formazan. O sal de tetrazólio possui cor amarela e é solúvel em água e reativo à luz. Esse sal sofre uma reação de redução promovida pela enzima succinato-desidrogenase, presente no interior das mitocôndrias, transformando o sal em questão em formazan, que possui cor púrpura/azul escuro e é insolúvel em água, se acumulando no citoplasma das células viáveis.

Após cada período, o meio de cultura com tratamento foi removido e adicionado por poço 110 µL de solução de MTT (5 mg/mL em meio de cultura), as células foram mantidas na incubadora à 37ºC por 4 horas. Após esse período, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan insolúveis em água gerados foram solubilizados usando 200 µL de DMSO. Como esta reação ocorre apenas em células vivas, quanto mais cristais foram produzidos mais a solução apresenta a cor púrpura e, portanto,

isto indica maior número de células viáveis. A absorbância da suspensão foi medida usando um espectrofotômetro com filtro de 550 nm (Synergy H1 multi-mode reader - BioTek Instruments, Winooski, VT). Para análise estatística, os dados de densidade óptica (DO) obtidos para cada grupo, foram apresentados como média e desvio padrão, convertidos previamente em viabilidade celular em percentual, usando a seguinte equação: (Tratamento de absorbância/ controle de absorbância) X 100. A função mitocondrial das células viáveis foi calculada em relação ao grupo controle positivo, em triplicata biológica.

4.3.2 Ensaio de Cristal Violeta

O corante cristal violeta também é utilizado para determinar a viabilidade celular por possuir habilidade de ligação ao DNA da célula. Após cada período de tratamento das células, o meio de cultura foi totalmente removido para efetuar a coloração com cristal violeta em placas de 96 poços, 50 µL da solução de coloração de cristal violeta a 0,5% foram adicionados aos poços e mantidos por 20 minutos à temperatura ambiente. Sequencialmente, a solução de cristal violeta foi removida e a placa lavada quatro vezes em água corrente. Após a lavagem, a placa foi invertida sobre papel de filtro e batida levemente para remover qualquer líquido remanescente. A placa foi seca sem a tampa por pelo menos 2 horas em temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, foi adicionado 200 µL de metanol a cada poço por 20 minutos em temperatura ambiente para diluição dos cristais. A absorbância da suspensão foi medida usando espectrofotômetro a 570 nm (Synergy H1 multi-mode reader - BioTek Instruments, Winooski, VT). Os resultados foram convertidos em viabilidade celular em percentual, usando a seguinte equação: (Tratamento de absorbância/ controle de absorbância) X 100.

4.4 Ensaio de cicatrização de feridas (*Wound healing assay*)

O ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* (*Wound healing assay*) foi realizado avaliando a capacidade de migração dos fibroblastos de camundongos NIH 3T3 baseado no modelo descrito por BÜRK (1973), com adaptações. As células foram plaqueadas na densidade de $1x10^5$ células/poço em placas de 12 poços. As células

foram mantidas em estufa por 72 horas para adquirir a confluência total. Em seguida os poços foram tratados com 5 µg/mL de mitomicina C (antiproliferativo) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. Os poços foram lavados com PBS 1X e foi feita uma lesão na monocamada com ponteira de 200µL, formando uma fenda na vertical. Sequencialmente, os poços foram lavados 3x com PBS 1X e acrescentado meio de cultura suplementado com 10% SFB com os grupos dos compostos CHX e PHY definidos pelos ensaios de viabilidade, utilizando as concentrações de 0,0075% (0,075 mg/mL) e 0,12% (1,2 mg/mL). Meio completo sem adição dos compostos foi usado como controle. Dessa forma, foram capturadas imagens das fendas no tempo zero e 24, 48 e 72 horas após o tratamento, utilizando microscópio óptico invertido Olympus U-TV0.5XC-3 (Olympus, Tokyo, Japan). O fechamento da fenda foi calculado por meio da comparação entre a distância no período experimental inicial (0 horas) e os estudados (24, 48 e 72 horas) e comparação estatística feita sempre em relação ao grupo controle (sem tratamento). Foi realizada triplicata biológica e para cada experimento, um total de 3 lesões foram medidas por grupo e os resultados analisados usando o Software Image J (Research Services Branch, National Institute Of Health Image - NHI, Bethesda, Maryland, EUA).

4.5 Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão (DP) dos três experimentos independentes. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, apresentando parâmetros normais de distribuição, dessa forma foi utilizado o teste ANOVA. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste post-hoc de Dunnett, Bonferroni ou Tukey em $p<0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados através do programa GraphPad Prism 7.04 (GraphPad, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise de viabilidade celular

5.1.2 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT demonstrou no tempo de 1 minuto de contato das células com os tratamentos (Gráfico 1) que o grupo CHX, em todas as concentrações estudadas, apresentou menor porcentagem de viabilidade celular com diferença estatisticamente significante comparado ao controle positivo, ademais, apenas as concentrações mais baixas do grupo CHX (0,0075% e 0,015%) apresentaram viabilidade celular detectável. Já no grupo PHY, na concentração de 0,0075% houve maior porcentagem de viabilidade com diferença estatística significante comparado ao controle positivo; na concentração de 0,015% não houve diferença estatística em relação ao controle e as concentrações maiores (0,03%; 0,06% e 0,12%) tiveram menores porcentagens de viabilidade comparadas ao controle positivo com diferença estatisticamente significante. Entre os grupos dos compostos CHX e PHY, pode-se observar maiores porcentagens de viabilidade celular no grupo PHY em relação ao CHX com diferença estatisticamente significante, mesmo considerando-se as diferentes concentrações.

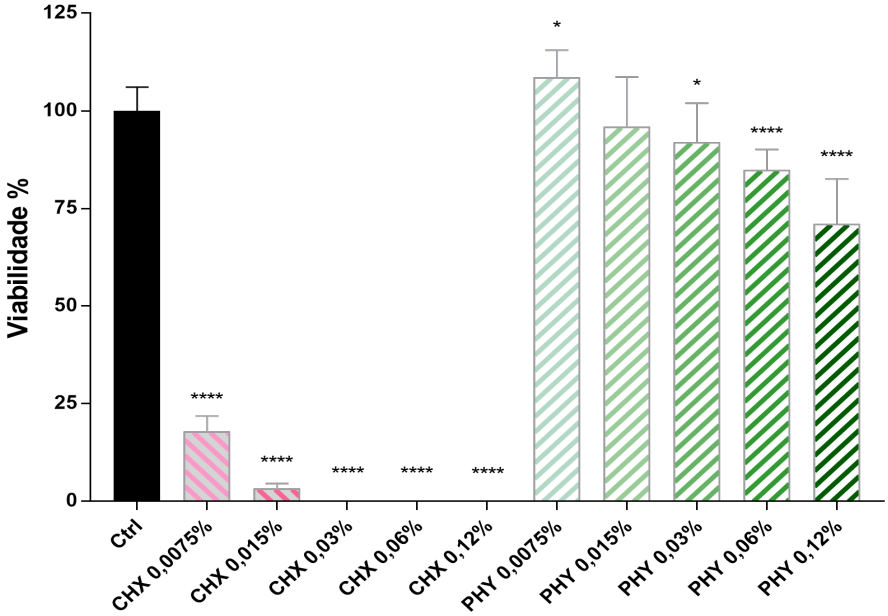

Gráfico 1 - Gráfico representativo do ensaio de MTT no tempo de 1 minuto de contado das células com os grupos experimentais

No tempo de 24 horas de contato (Gráfico 2) observou-se ainda a diferença estatisticamente significante com menores porcentagens de viabilidade nas diferentes concentrações do grupo CHX em relação ao controle positivo. As concentrações de 0,0075% e 0,015% do grupo PHY não apresentam diferença estatística em relação ao controle positivo e as concentrações seguintes (0,03%; 0,06% e 0,12%) tiveram menores porcentagens com diferenças estatisticamente significantes comparados ao controle positivo.

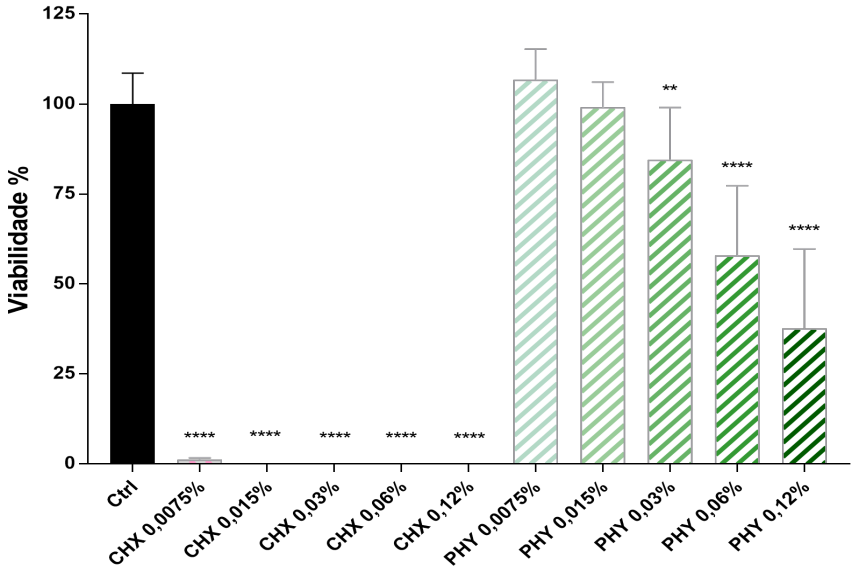

Gráfico 2 - Gráfico representativo no ensaio de MTT do tempo de 24 horas de contado das células com os grupos experimentais

O ensaio demonstrou que após 48 horas de contato do grupo PHY com as células (Gráfico 3), os resultados são semelhantes ao período de 24 horas, no qual as concentrações de 0,0075% e 0,015% não apresentam diferença estatística em relação ao controle positivo e as concentrações de 0,03%, 0,06% e 0,12% tiveram menores porcentagens que o controle positivo com diferença estatisticamente significante.

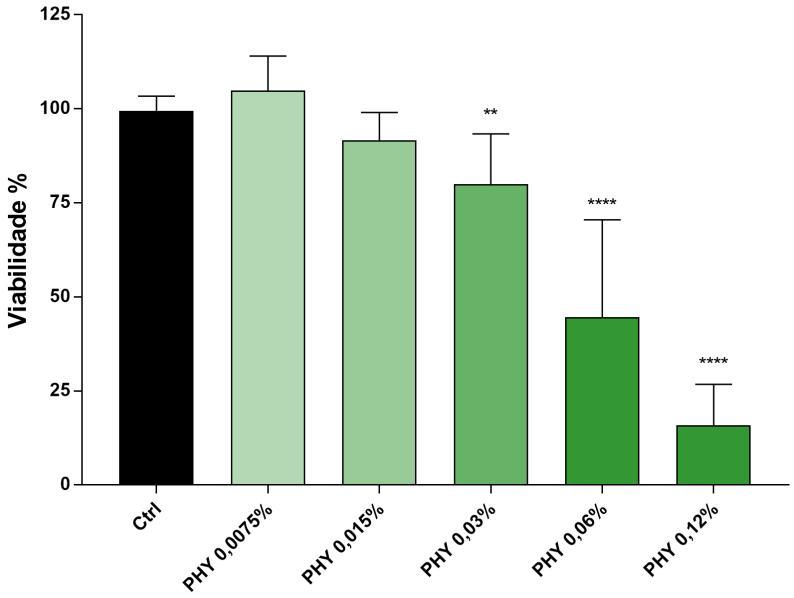

Gráfico 3 - Gráfico representativo do ensaio de MTT no tempo de 48 horas de contado das células com o grupo PHY

A partir dos resultados do experimento, foi possível calcular o IC_{50} do grupo PHY em 24 horas (Gráfico 4) e 48 horas (Gráfico 5). Esse valor representa a concentração de PHY que mantém 50% de viabilidade celular nos períodos analisados. Em 24 horas, o IC_{50} foi 0,081% e em 48 horas o IC_{50} foi 0,054%.

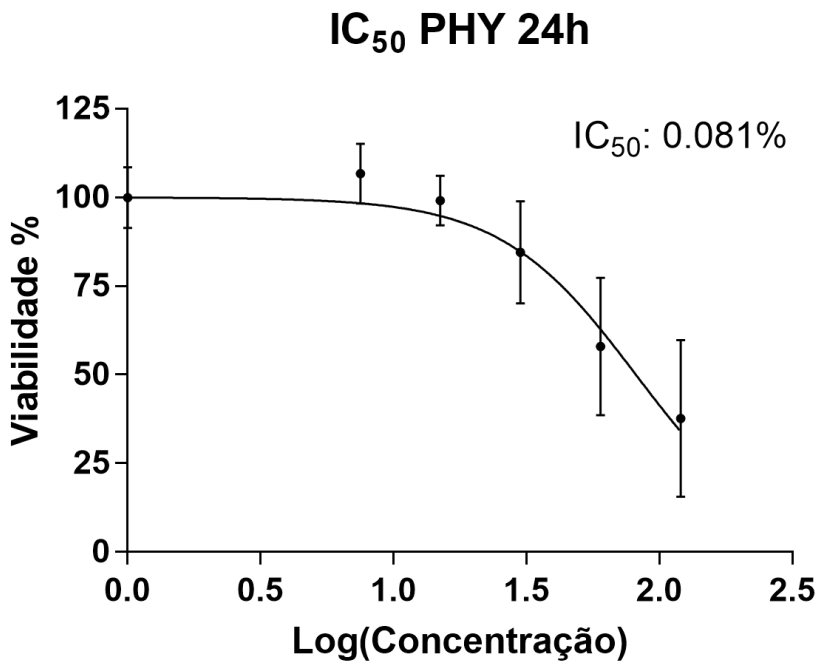

Gráfico 4 - IC_{50} do grupo PHY no tempo de 24h

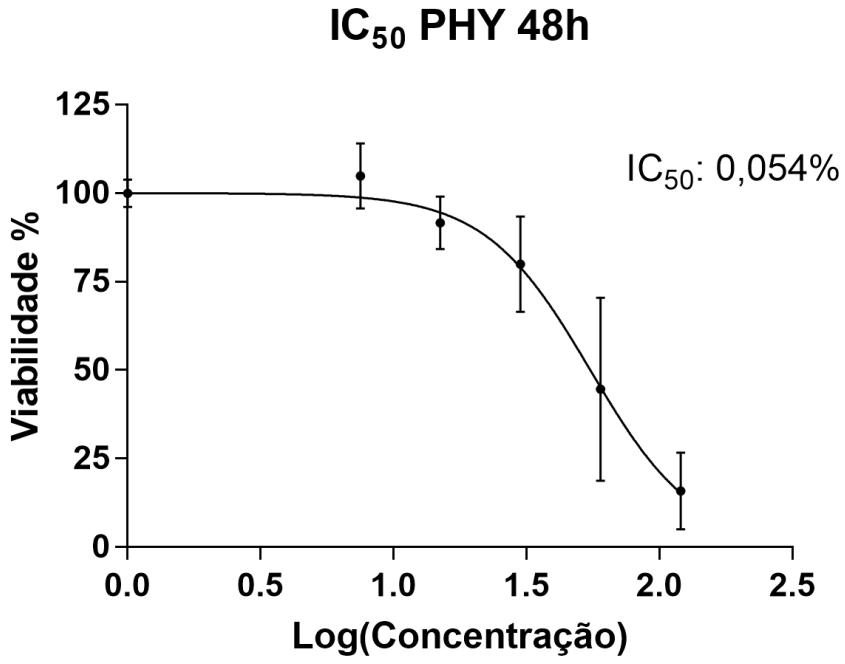

Gráfico 5 - IC_{50} do grupo PHY no tempo de 48h

5.1.3 Ensaio de cristal violeta

A análise da viabilidade celular pelo ensaio de Cristal Violeta verificou que os ambos grupos experimentais apresentaram porcentagens menores de viabilidade celular em relação ao controle positivo ($p<0,05$) (Gráfico 6). Após 1 minuto de contato com os tratamentos, apesar das menores porcentagens de viabilidade com diferença estatisticamente significante, as concentrações de 0,075mg/mL e 1,2mg/mL (0,0075% e 0,12%) de PHY ainda mantém a viabilidade celular acima de 50%, o que não ocorre com o grupo CHX.

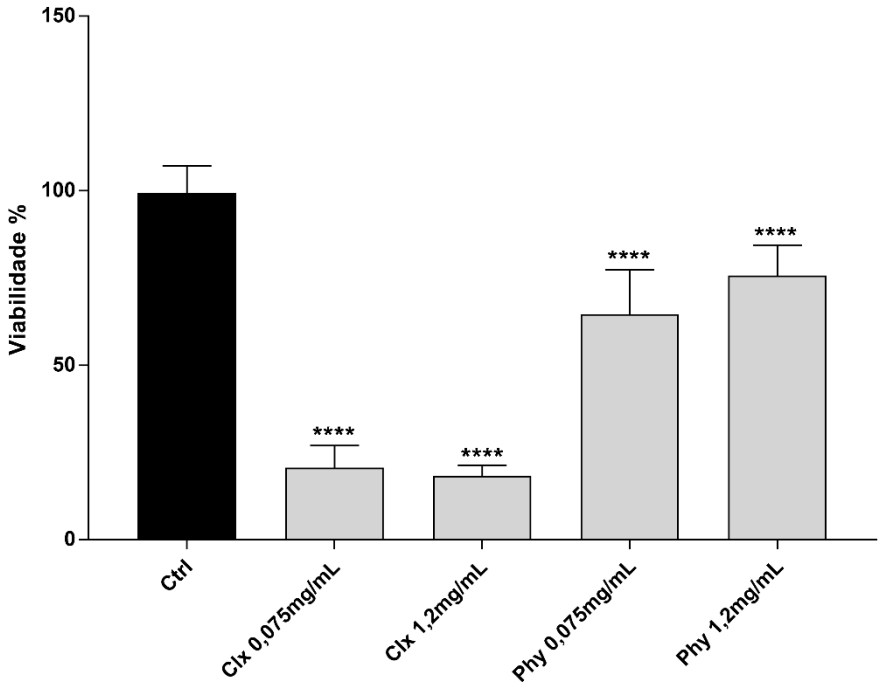

Gráfico 6 - Gráfico representativo do ensaio de Cristal Violeta

5.2 Ensaio de cicatrização de feridas

O ensaio de cicatrização de feridas revelou que ambas concentrações de PHY (0,0075% e 0,12%) não influenciaram negativamente na migração celular nos períodos analisados, já no grupo CHX, apenas a concentração de 0,0075% permitiu o fechamento da ferida, o que não ocorreu na concentração de 0,12%. Pode-se observar que o percentual de fechamento da ferida (Gráfico 7) do grupo PHY nas duas

concentrações são semelhantes ao controle positivo do tempo 0 até 72 horas, sem diferença estatística entre as concentrações, ambas permitindo o fechamento da ferida ao final do experimento. O grupo CHX na concentração de 0,0075% não apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo, também permitindo o fechamento da ferida experimental ao final do período analisado. Por outro lado, a concentração de CHX 0,12% influenciou negativamente e não permitiu a migração celular em nenhum dos períodos analisados, apresentando diferença estatisticamente significante menor em relação ao controle positivo e aos grupos experimentais do estudo. Na comparação entre os grupos, o grupo PHY (0,0075%) em 48 horas apresentou melhor fechamento da fenda ($p<0,05$) comparado com o grupo CHX (0,0075%).

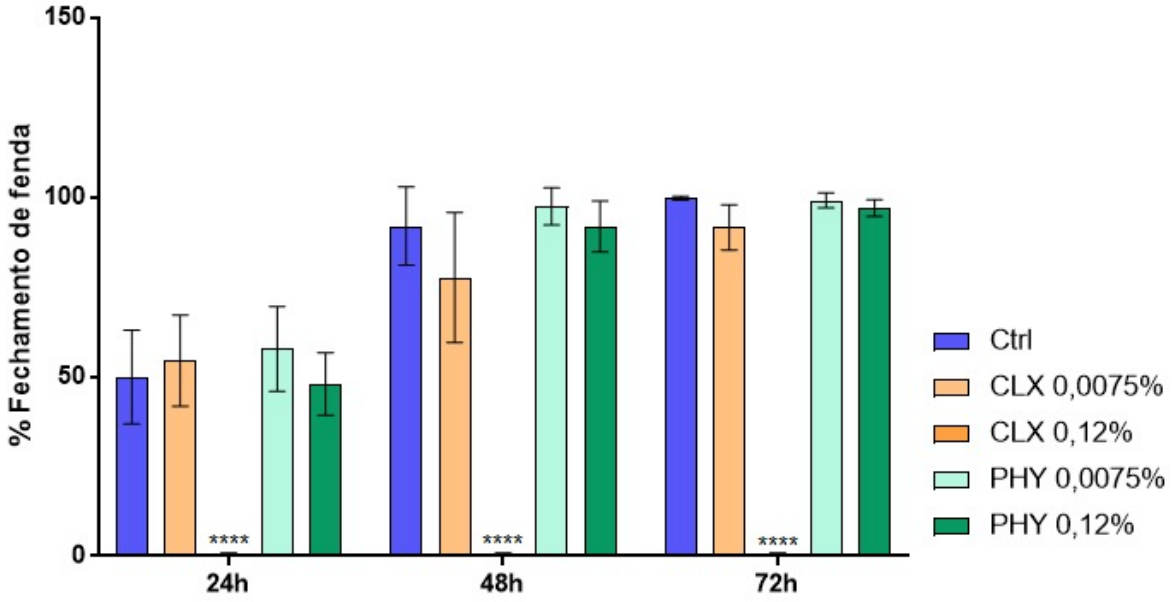

Gráfico 7 - Gráfico do percentual de fechamento da fenda no ensaio de cicatrização de feridas

As fotomicrografias do experimento permitem a visualização do Controle Positivo (Figura 2-5) no qual as células migraram em 24h e após 72h apresentam fechamento da ferida experimental comparado ao período inicial 0h.

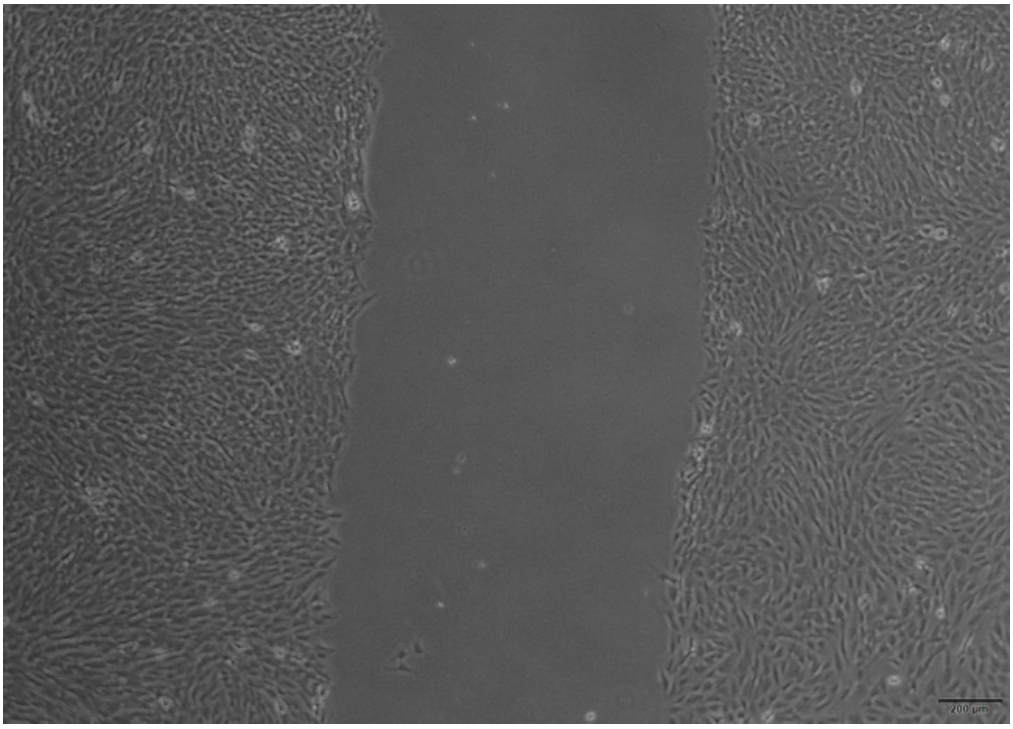

Figura 2 - Controle Positivo tempo 0h

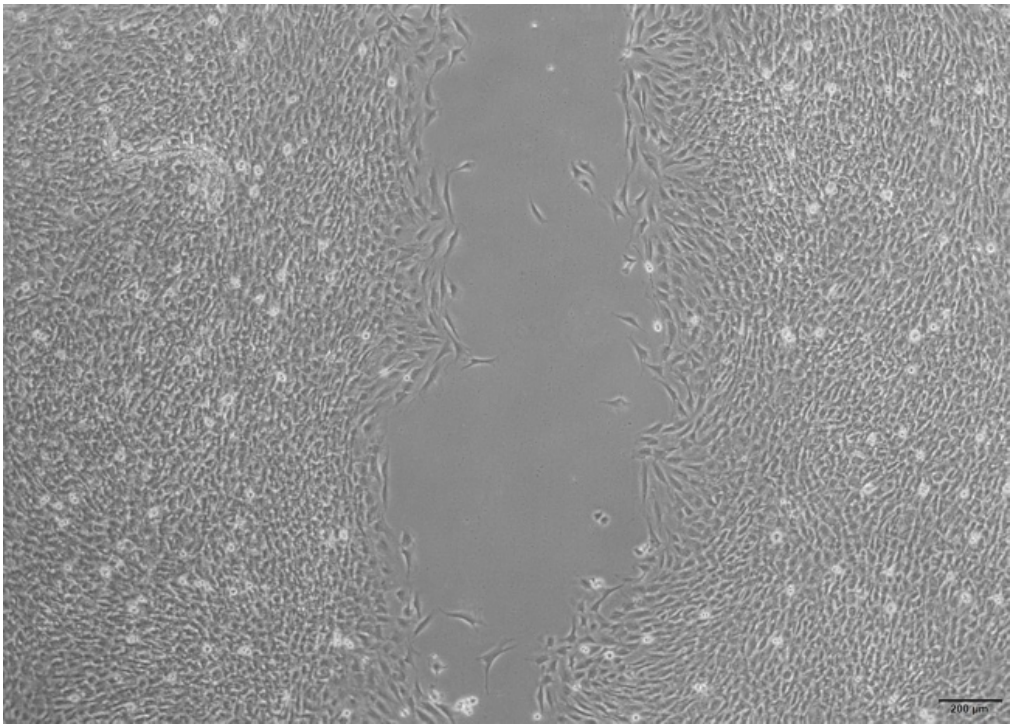

Figura 3 - Controle Positivo tempo 24h

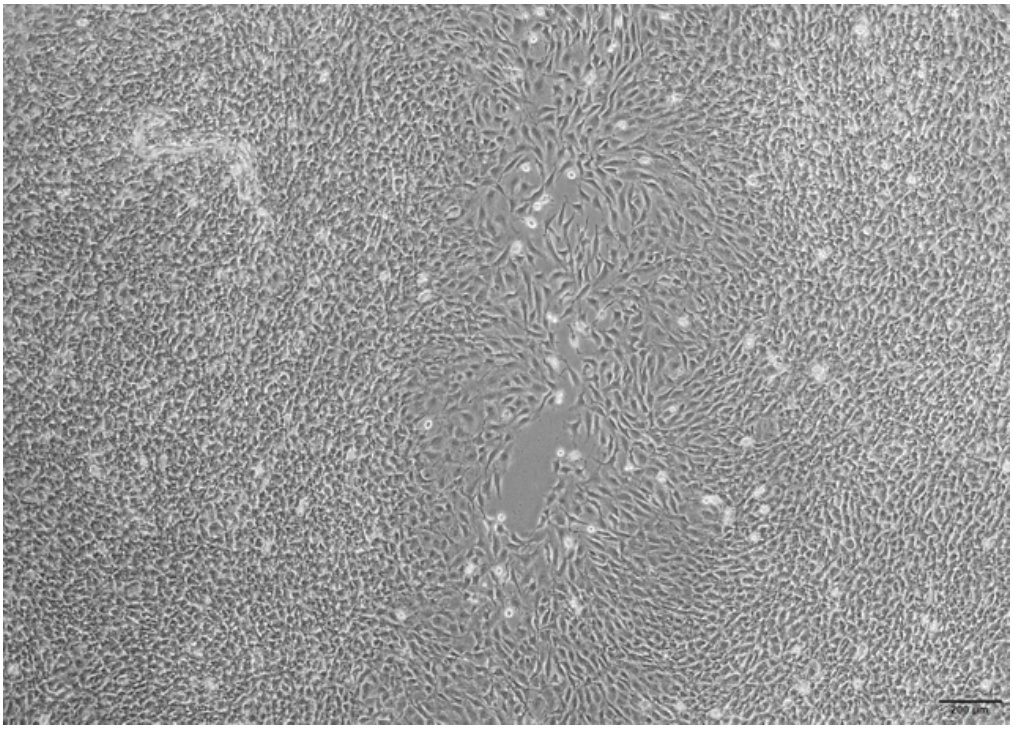

Figura 4 - Controle Positivo tempo 48h

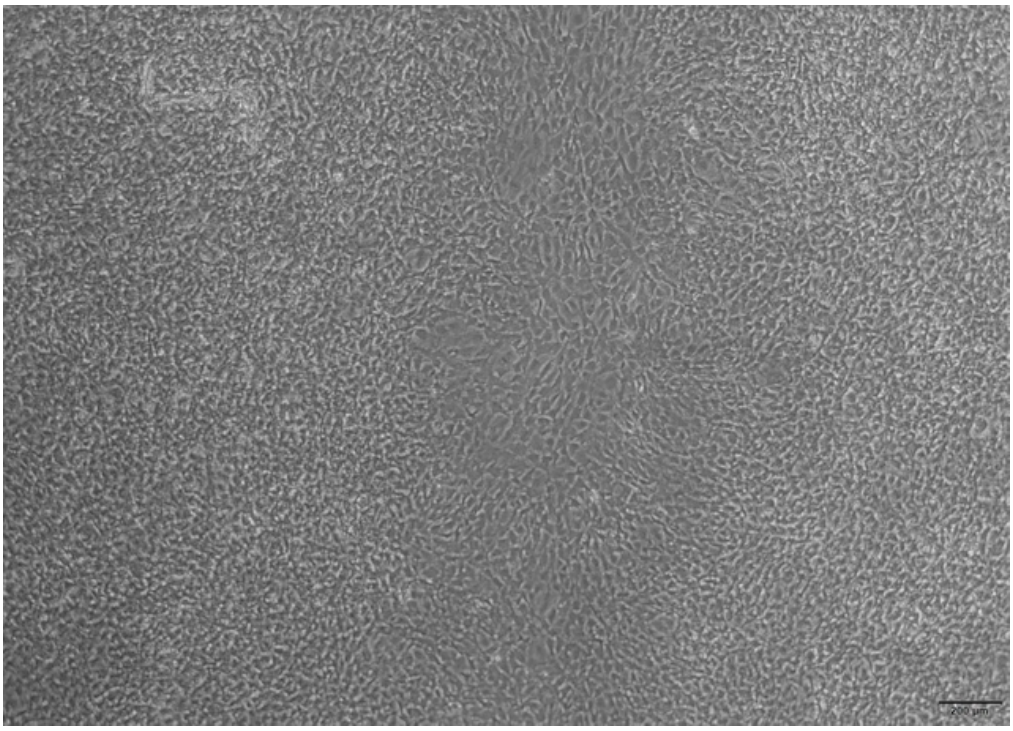

Figura 5 - Controle Positivo tempo 72h

Na concentração mais baixa de 0,0075% do grupo CHX (Figuras 6-9) pode-se observar que a fenda foi fechada após o período experimental (0-72h), sem diferença comparado ao grupo controle.

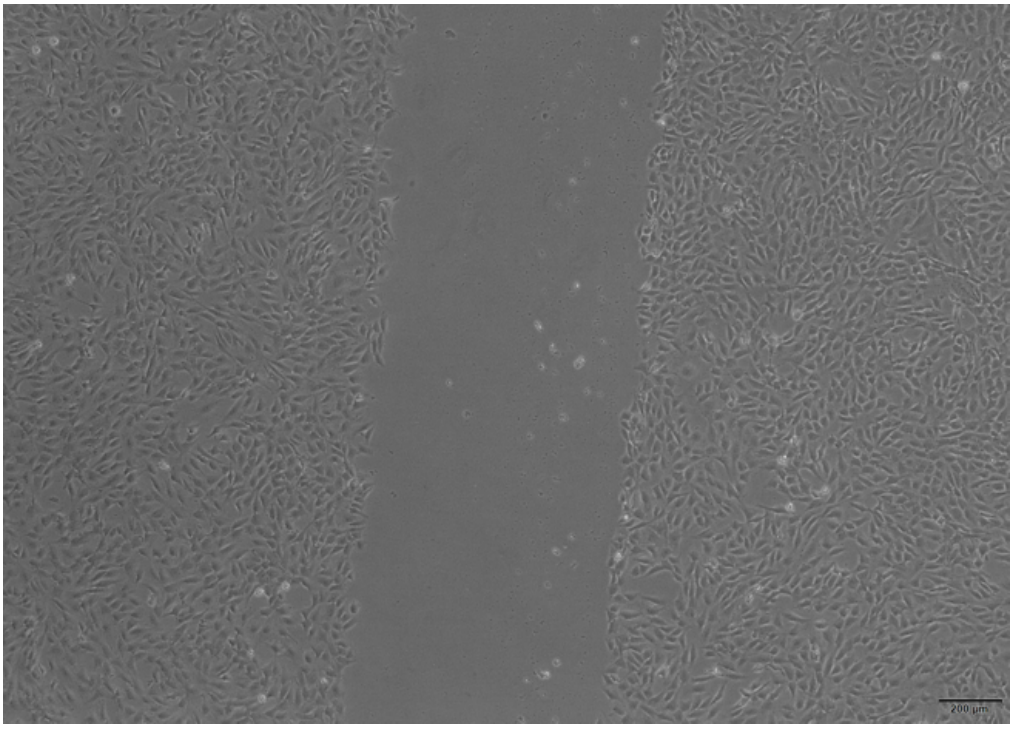

Figura 6 - Grupo CHX 0,0075% tempo 0h

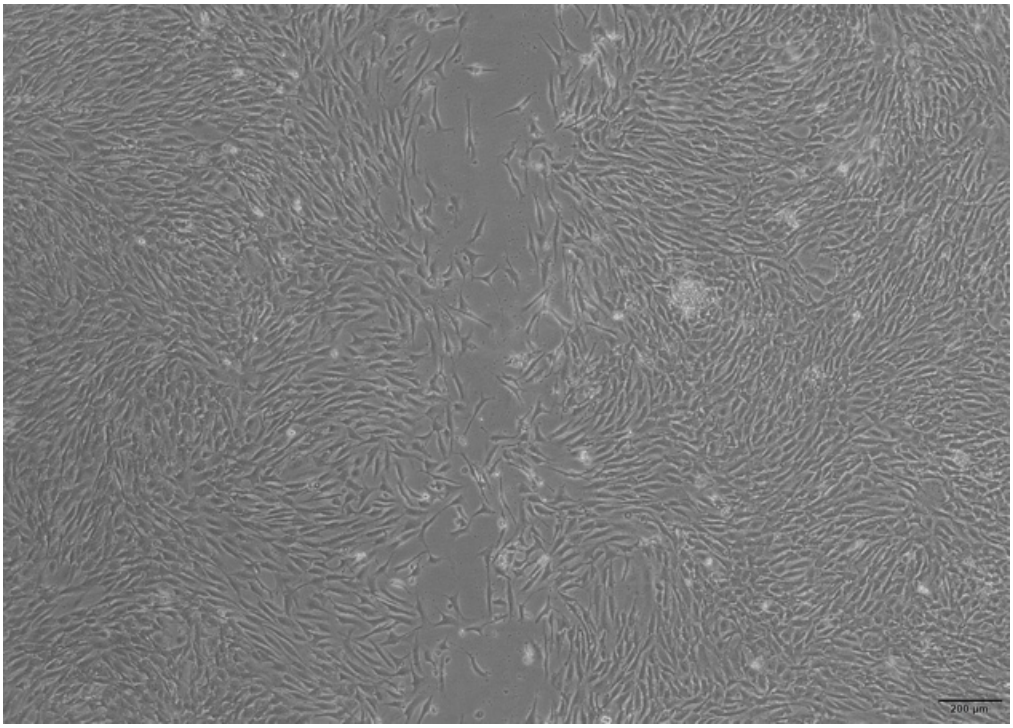

Figura 7 - Grupo CHX 0,0075% tempo 24h

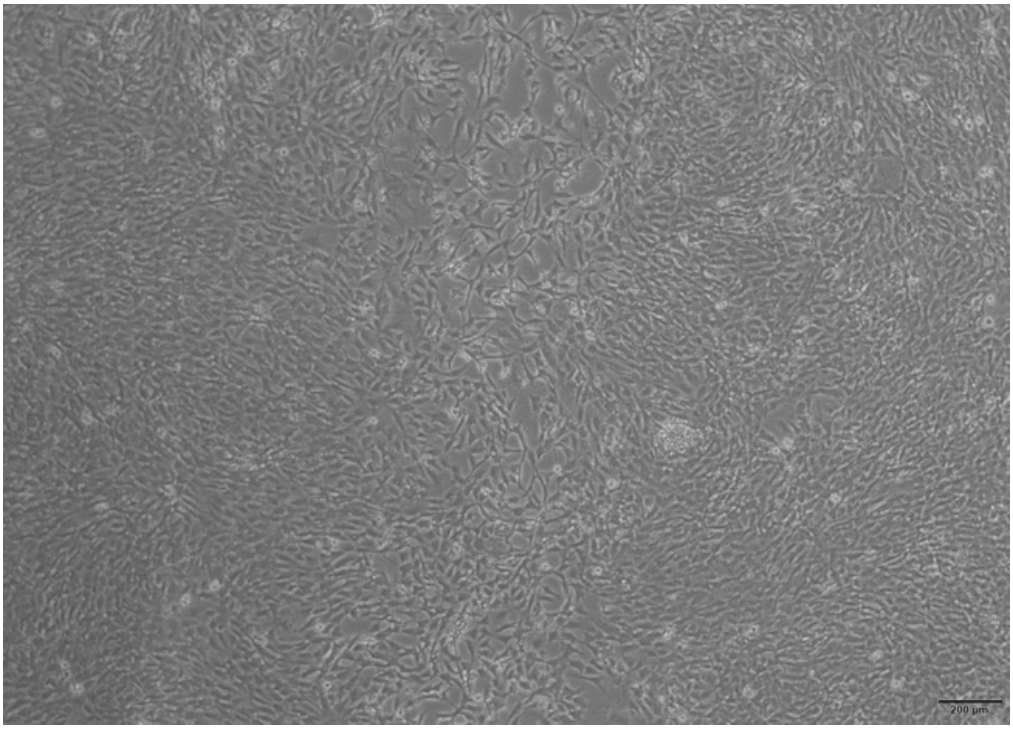

Figura 8 - Grupo CHX 0,0075% tempo 48h

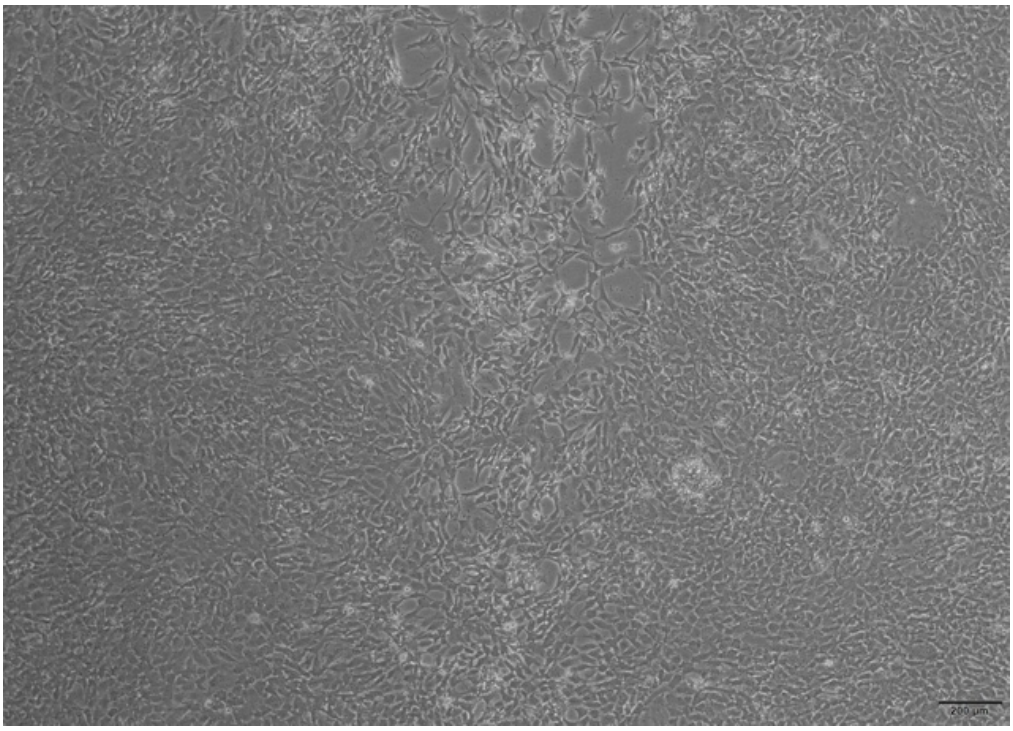

Figura 9 - Grupo CHX 0,0075% tempo 72h

Na concentração de 0,0075% do grupo PHY (Figuras 10-13) é possível constatar fechamento da ferida experimental em 72 horas (Figura 13).

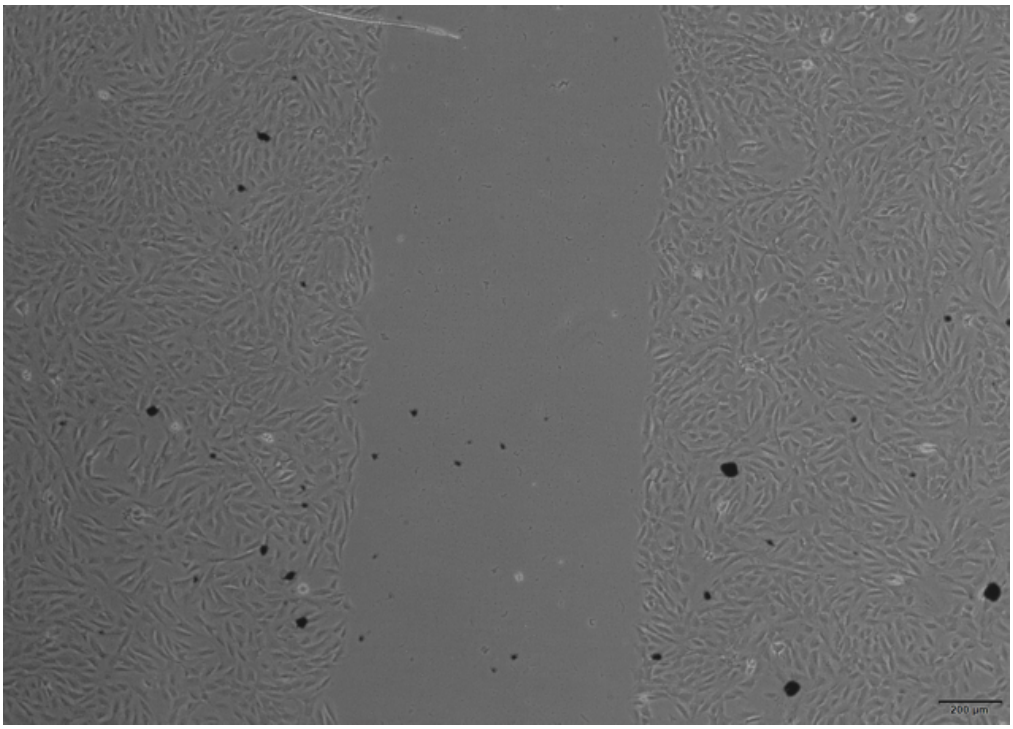

Figura 10 - Grupo PHY 0,0075% tempo 0h

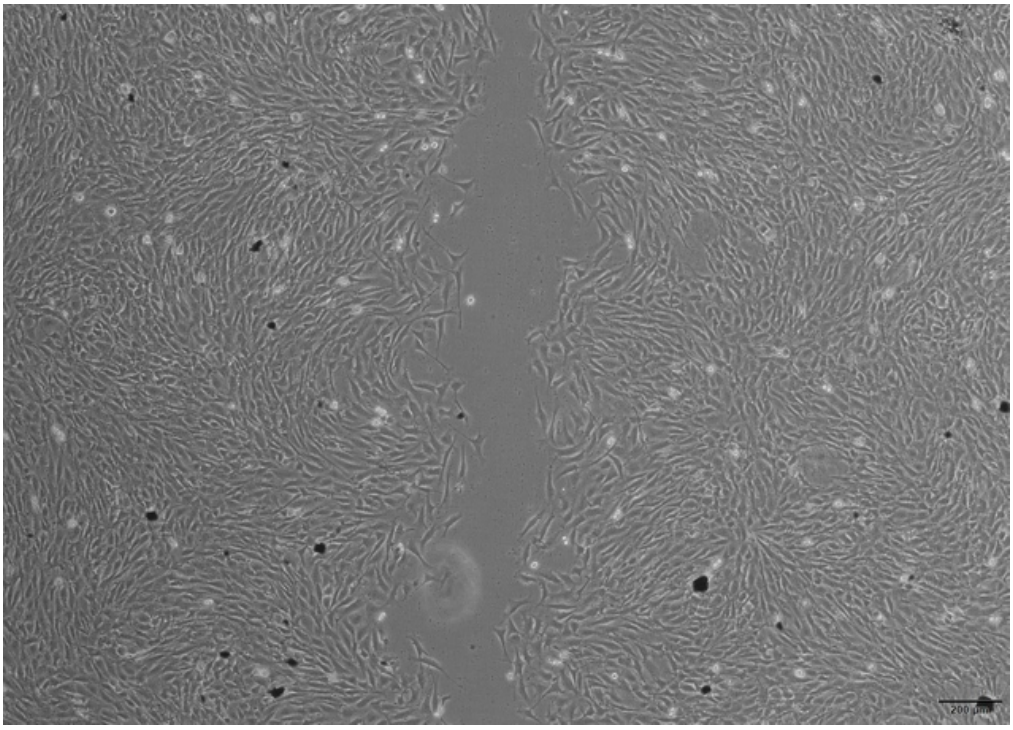

Figura 11 - Grupo PHY 0,0075% tempo 24h

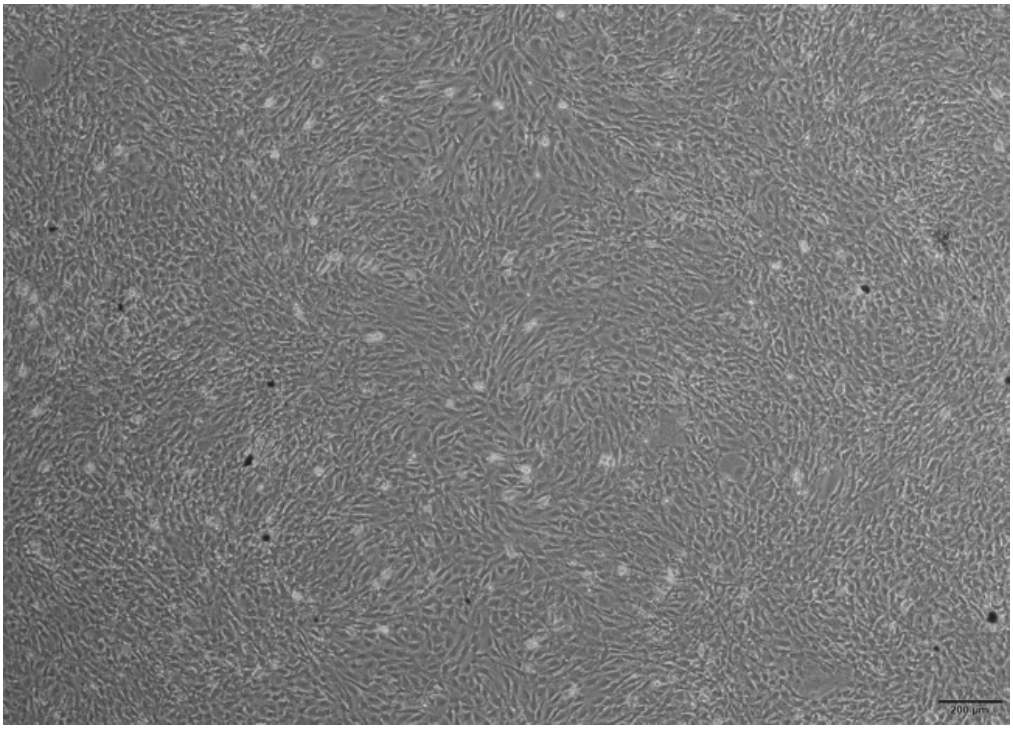

Figura 12 - Grupo PHY 0,0075% tempo 48h

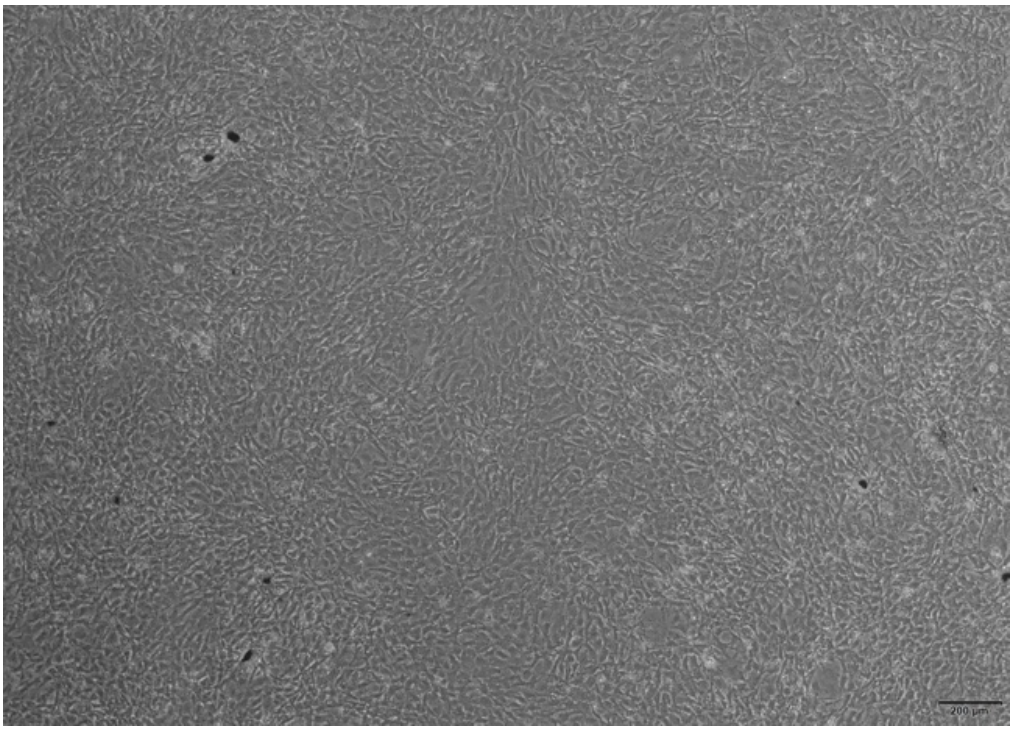

Figura 13 - Grupo PHY 0,0075% tempo 72h

Quando as células foram expostas a concentração de 0,12% do grupo CHX (Figuras 14-17), pode-se verificar que a CHX interferiu negativamente na migração celular em todos os períodos, sendo que mesmo em 72h (Figura 17) não observou-se migração celular.

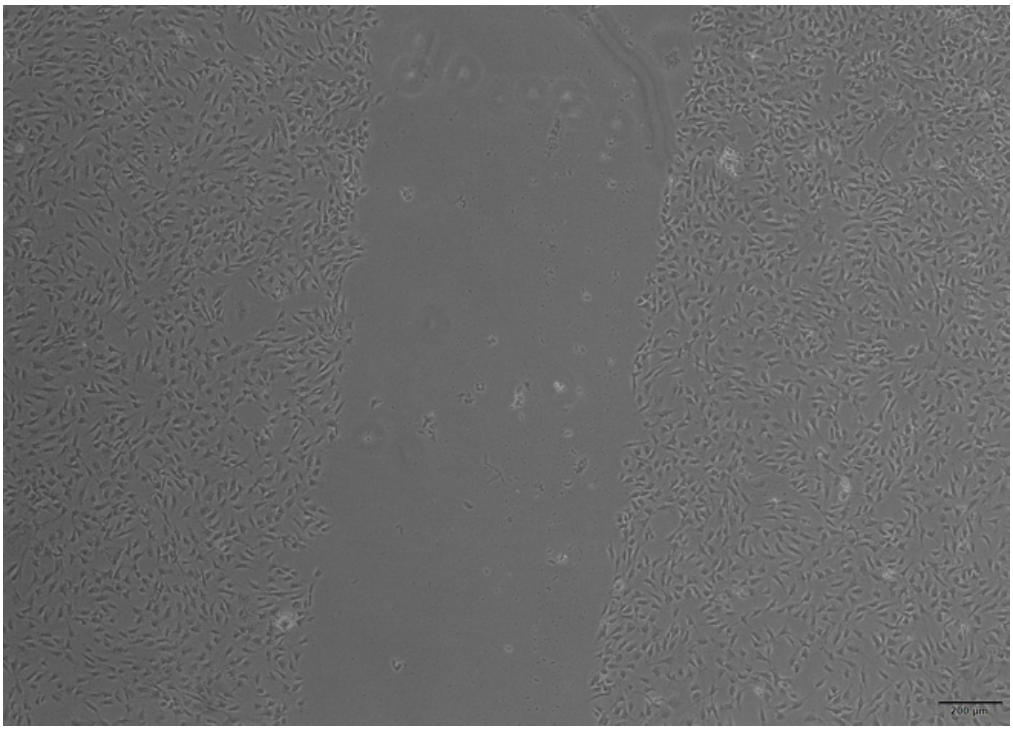

Figura 14 - Grupo CHX 0,12% tempo 0h

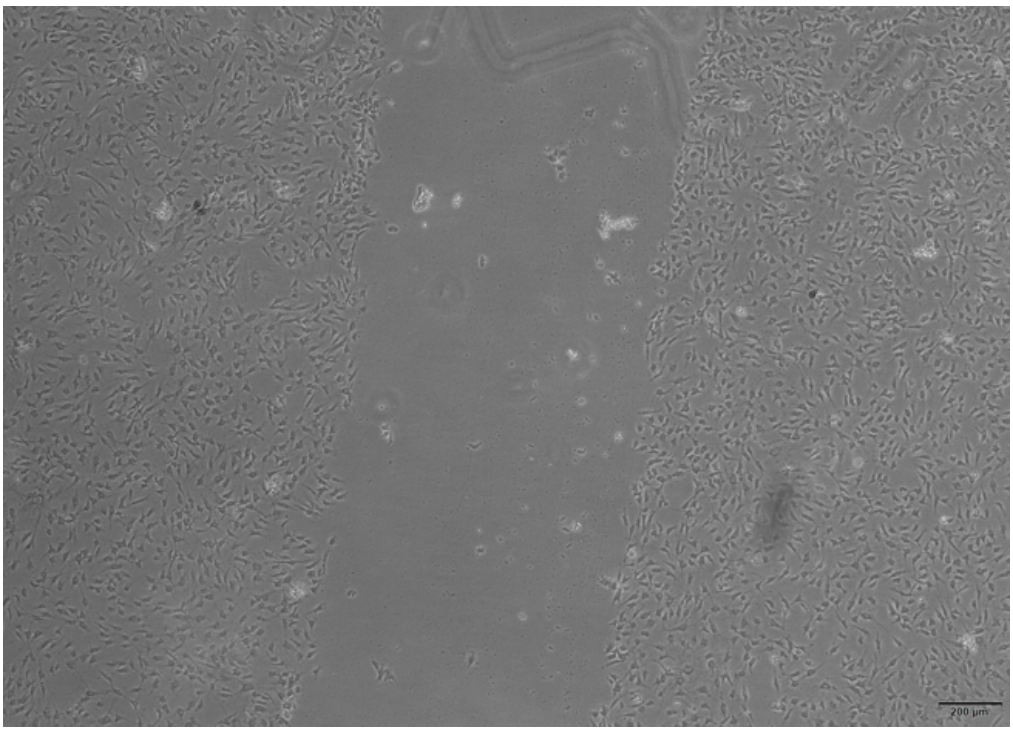

Figura 15 - Grupo CHX 0,12% tempo 24h

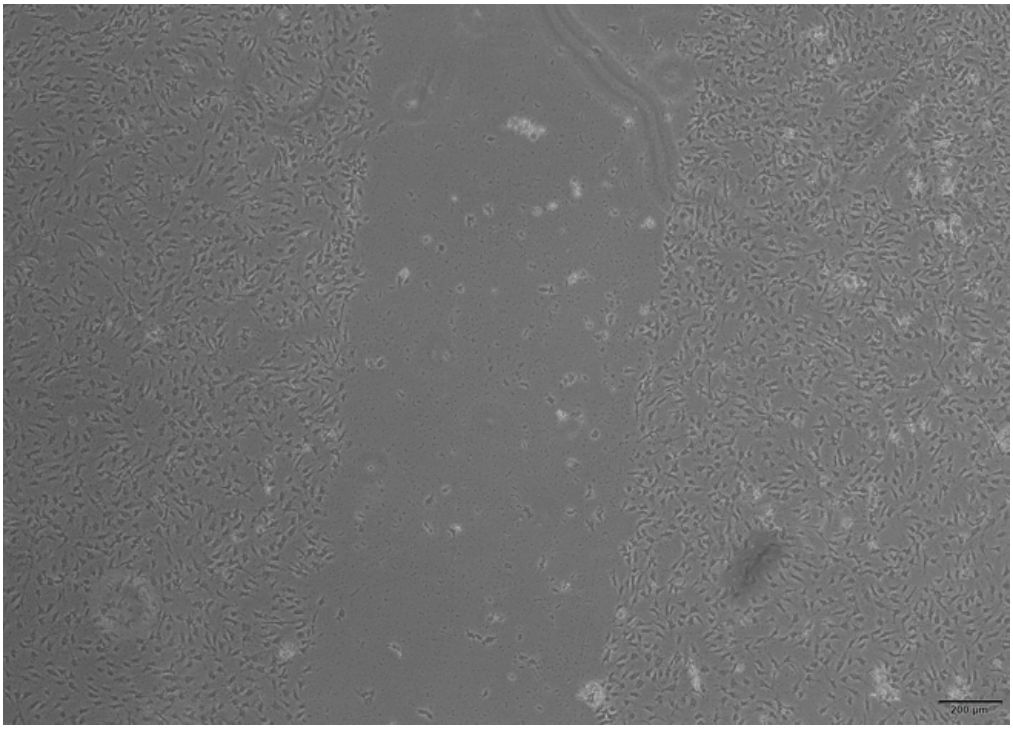

Figura 16 - Grupo CHX 0,12% tempo 48h

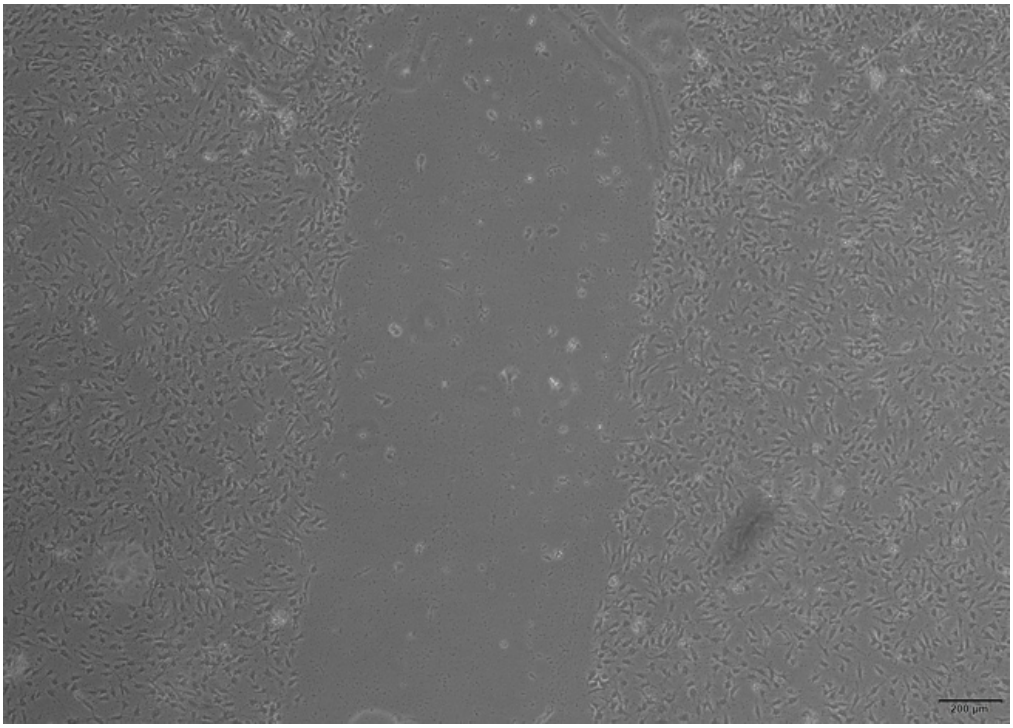

Figura 17 - Grupo CHX 0,12% tempo 72h

Por outro lado, o grupo PHY 0,12% (Figuras 18-21) não interferiu negativamente no processo de migração celular, uma vez que pode-se observar que as células iniciaram a migração em 24h (Figura 19) e ao final de 72h (Figura 21) notou-se fechamento da fenda experimental.

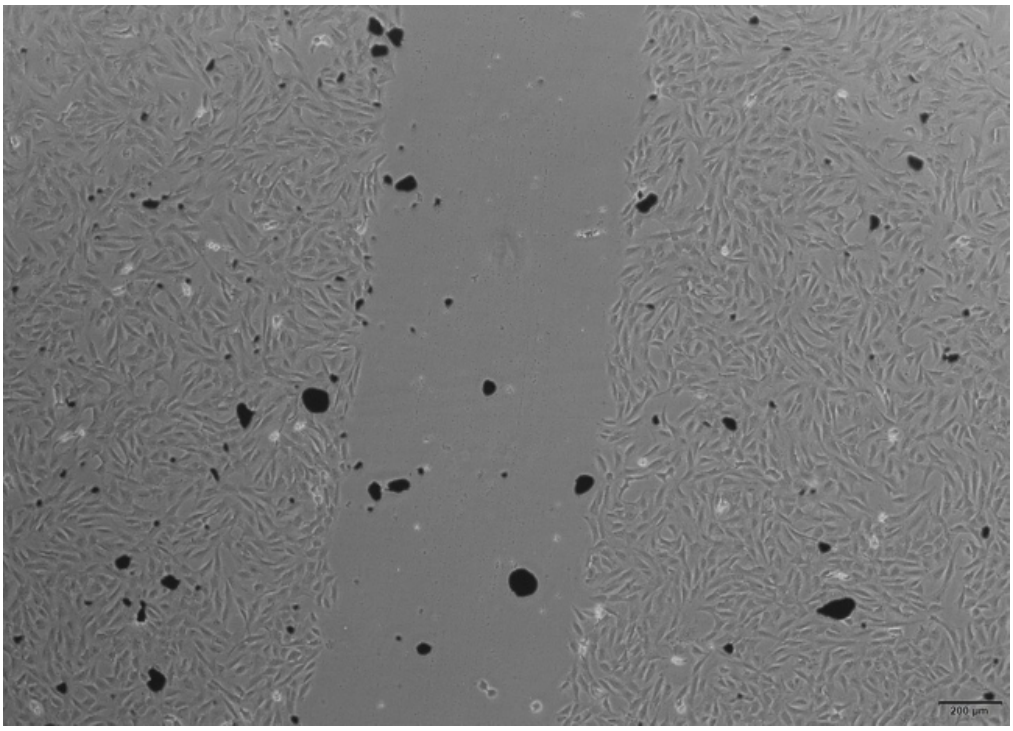

Figura 18 - Grupo PHY 0,12% tempo 0h

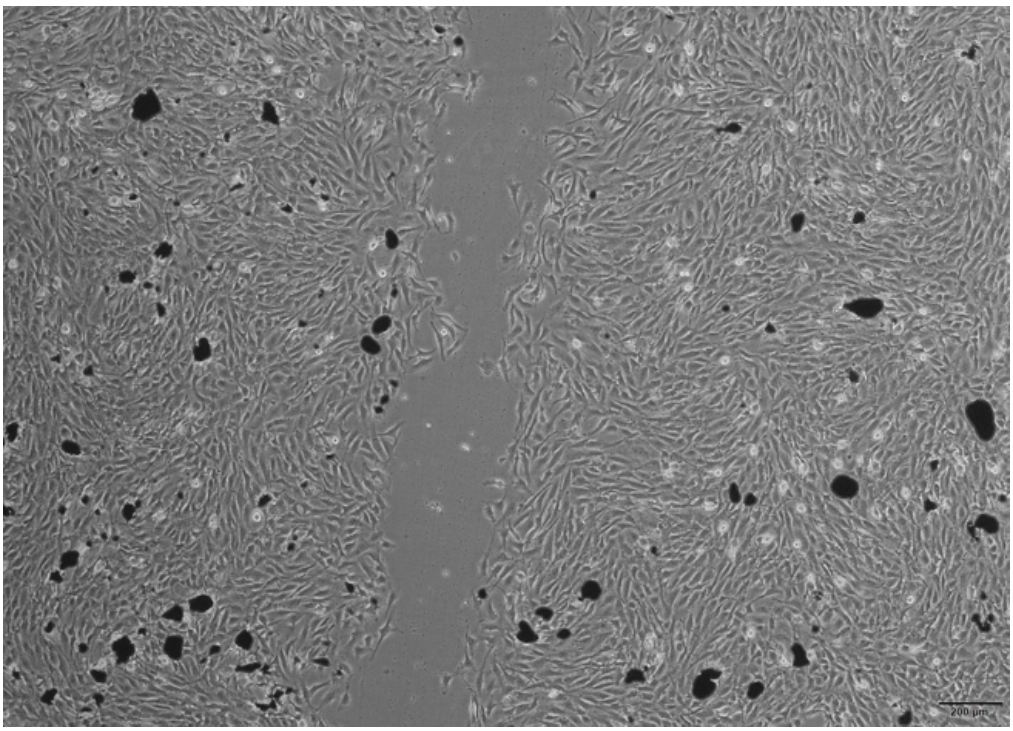

Figura 19 - Grupo PHY 0,12% tempo 24h

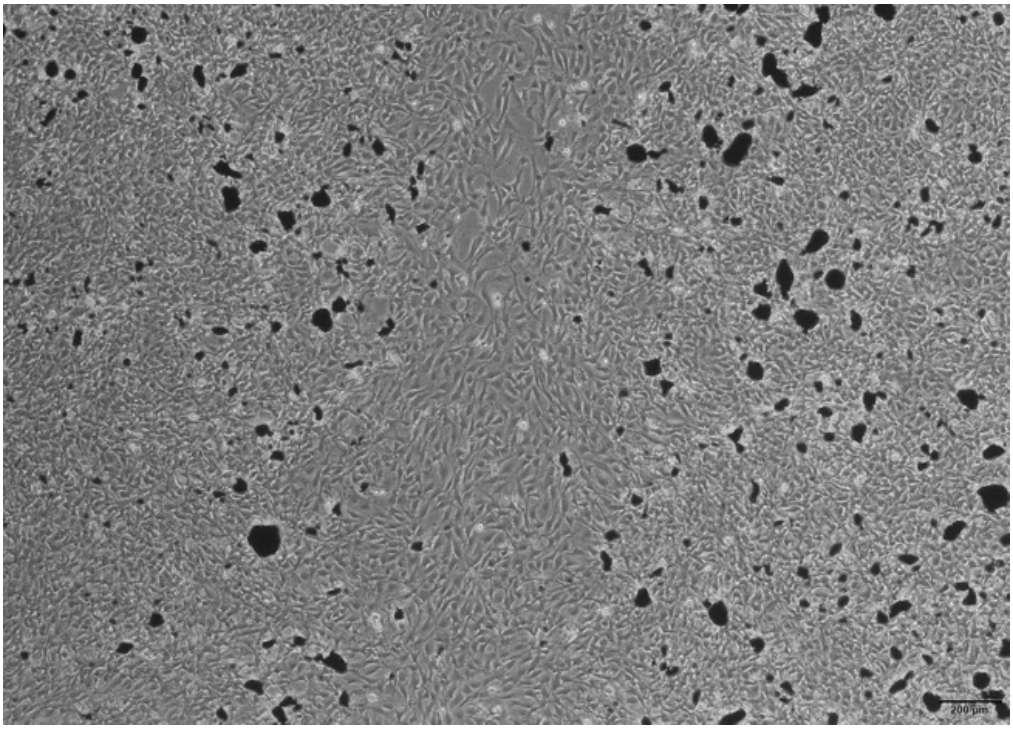

Figura 20 - Grupo PHY 0,12% tempo 48h

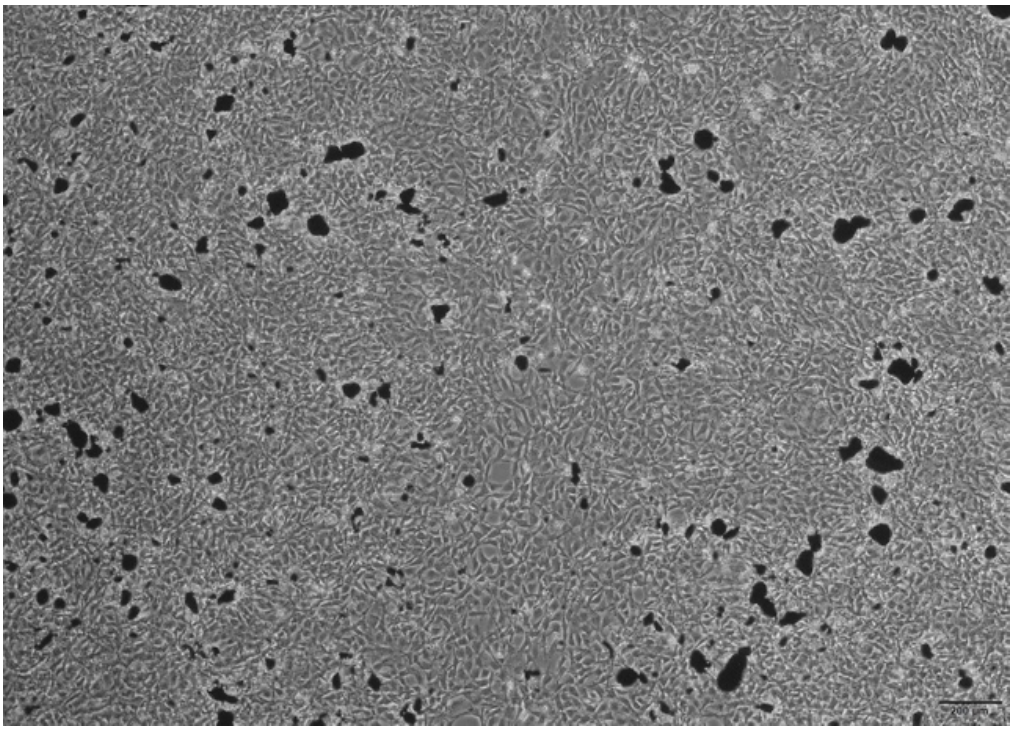

Figura 21 - Grupo PHY 0,12% tempo 72h

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou a PHY como uma possível alternativa a CHX. A PHY apresentou-se menos citotóxica comparada a CHX, a partir dos ensaios de viabilidade celular (MTT e CV). A PHY não interferiu na cicatrização experimental, permitindo a migração celular semelhante ao controle positivo nas duas concentrações estudadas de PHY 0,0075% e PHY 0,12%, a medida em que apenas CHX 0,0075% permitiu a migração de células. Em uma análise comparativa, PHY revelou menor citotoxicidade que CHX, sendo as concentrações de PHY 0,0075% e 0,015% atóxicas mesmo em 48 horas de contato com as células. Em 24 horas, o experimento revelou que PHY 0,081% é a concentração que mantém pelo menos 50% de viabilidade celular (IC_{50}), em 48 horas, IC_{50} foi PHY 0,054%; não foi possível calcular esse dado de CHX, uma vez que todas as concentrações foram inibidoras de mais de 50% da viabilidade celular. Até o momento, não existem estudos publicados com a metodologia apresentada comparando a CHX aos derivados de PHY.

O suporte científico é robusto que CHX tem um efeito bacteriostático quando usado em baixas concentrações e um efeito bactericida em altas concentrações, sendo eficaz agente anti-placa e considerado padrão ouro no controle químico de biofilme (LÖE; SCHIØTT, 1970). Essas ações são baseadas em sua capacidade de alterar a integridade da membrana bacteriana, levando ao aumento da permeabilidade, vazamento de íons intracelulares e permitindo maior entrada de CHX no citoplasma (HUGO; LONGWORTH, 1964). Devido suas propriedades antimicrobianas, a CHX foi introduzida no mercado em diferentes concentrações e formulações e em diversos produtos comerciais para higiene oral como enxaguatórios, cremes dentais, géis e sprays. No entanto, cada vez mais aumentam as evidências de que a CHX têm efeitos citotóxicos em diversas células *in vitro* (MADHUSUDANAN; RENJITH, 2020; BERNER *et al*., 2020; COELHO *et al*., 2019; DOGAN *et al*., 2003; HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; LIU *et al*., 2018; MARIOTTI; RUMPF, 1999; PUCHER; DANIEL, 1992; SAWADA *et al*., 2015; SCHMIDT *et al*., 2015; SUKUMARAN; VADAKKEKUTTICAL; KANAKATH, 2020; THOMAS et al., 2009; TSOUROUNAKIS *et al*., 2012; WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA *et al*., 2016; YAYLI *et al*., 2021; GIANNELLI *et al*., 2008; MÜLLER; KRAMER, 2008; REDDING; BOOTH,

1991; CABRAL; FERNANDES, 2007; CHANG *et al*., 2001; OK; ADANIR; HAKKI, 2015; DOAN *et al*., 2012) e clinicamente pode provocar distúrbios no paladar, pigmentação de dentes e irritação da mucosa (FLÖTRA *et al*., 1971; RICHARDS, 2017; PEGORARO *et al*., 2014). Contudo, os mecanismos relativos à sua citotoxicidade não foram bem definidos até o momento (GIANNELLI *et al*., 2008).

A concentração recomendada clinicamente de CHX em soluções para bochecho varia de 0,12% ou 0,2%. Em nosso estudo, observou-se que a CHX 0,12% com um intervalo curto (1 min) de contato com fibroblastos NIH 3T3 foi citotóxica e inibiu a viabilidade celular. Corroborando com nossos resultados, Sukumaran e cols. (SUKUMARAN; VADAKKEKUTTICAL; KANAKATH, 2020), Tsourounakis e cols. (TSOUROUNAKIS *et al*., 2012) e Giannelli e cols. (GIANNELLI *et al*., 2008) verificaram que CHX 0,12% em um minuto de contato induziu morte e alteração da função mitocondrial das células.

O uso de CHX no pós-operatório de cirurgias periodontais é recomendado pelo seu efetivo efeito anti-placa. Aliado ao controle mecânico nas áreas periféricas a região operada, o controle químico com o antisséptico permite manutenção de um ambiente mais favorável para cicatrização, uma vez que na presença de quantidades menores de biofilme a região cicatriza mais rapidamente e com menos complicações do que quando se acumulam grandes quantidades de biofilme bacteriano. Logo, a remoção de biofilmes recém-formados desempenha um papel crucial na fase inicial de cicatrização e em resultados de cirurgias periodontais com sucesso a longo prazo (WESTFELT, 1996). Sabe-se que durante a primeira fase da cicatrização de feridas, células inflamatórias são recrutadas para a ferida para prevenir infecções e limpar a ferida. A etapa subsequente é caracterizada pela proliferação celular a fim de formação de um tecido de granulação. A última etapa é a remodelação da matriz extracelular que aumenta a resistência à tração da ferida, resultando na restauração da integridade anatômica e funcional do tecido (DESMET *et al*., 2015).

Estudos *in vitro* relevam que CHX mesmo em concentrações menores da utilizada clinicamente influenciam negativamente a cicatrização experimental de feridas. Thomas e cols. (THOMAS *et al*., 2009) observaram que CHX 0,0032% e CHX 0,2% são capazes de alterar quase em 80% a migração de fibroblastos, já concentrações mais baixas, CHX 0,0016% e CHX 0,0008%, permitem que a ferida

experimental se feche. Este resultado também foi observado por Berner e cols., no qual CHX 0,00039% teve resultado semelhante ao controle positivo após 48 horas (BERNER *et al*., 2020). Em outro estudo, CHX 0,002% permitiu a migração celular de fibroblastos no ensaio de cicatrização de feridas, contudo, impediu feridas experimentais de mioblastos e osteoblastos se fechassem igualmente ao controle (LIU *et al*., 2018). Semelhantemente, o ensaio de cicatrização de feridas do nosso trabalho certificou que CHX 0,0075% permite que ocorra migração similar ao controle positivo, por outro lado, CHX 0,12% inibe 100% a migração celular *in vitro*.

Apesar dessa influência negativa demonstrada experimentalmente, os estudos *in vivo* revelam que CHX contribui positivamente para o fenômeno da cicatrização. Um experimento em animais com análise histométrica demonstrou que com o uso de CHX 0,2% após procedimento cirúrgico periodontal a ferida regenera-se com níveis menores de infiltrado inflamatório, além da superfície dentária encontrar-se com menos biofilme que o grupo controle, como visto, condição favorável para cicatrização (HAMP; ROSLING; LINDHE, 1975). Quando em maiores concentrações, Bassetti e Kallenberger, concluíram que CHX 0,5% em feridas mucosas-ósseas em ratos atrasa significantemente a cicatrização da ferida clinicamente comparadas ao controle (BASSETTI; KALLENBERGER, 1980).

Em estudos clínicos, CHX 0,2% promoveu melhor cicatrização e menor acúmulo de placa comparada ao bochecho placebo em áreas que receberam procedimento cirúrgico periodontal (LANGEBAEK; BAY, 1976). Outros autores corroboram que CHX 0,12% não influencia negativamente e pode aumentar a eficiência na cicatrização precoce de feridas, além de ser mais efetiva no controle de placa na ausência de higiene oral mecânica pós-cirúrgica (GKATZONIS *et al*., 2018; KATSAROS *et al*., 2020).

Devido aos efeitos adversos clínicos e citotóxicos conhecidos de CHX, justifica-se a busca constante por produtos e alternativas que apresentem clinicamente benefícios semelhantes a CHX no controle de biofilme e assim favorecendo uma melhora na cicatrização, todavia, com menor citotoxicidade. Coelho e colaboradores verificaram que um enxaguatório enzimático (Biotène) é menos citotóxico que CHX 0,2% (COELHO *et al*., 2019). Um estudo com objetivo de comparar a citotoxicidade de um enxaguante bucal com octenidina (Octenidol) e CHX verificou que o mesmo

apresenta menor influência no metabolismo e melhor resultado de viabilidade celular, concluindo que o Octenidol pode ser uma alternativa a CHX, uma vez que apresenta menor efeito citotóxico (SCHIMIDT *et al*., 2015). Confrontando concentrações antibacterianas de CHX 0,1% e curcumina 0,003%, detectou-se que esse produto alternativo apresentou menor citotoxicidade que CHX, além de inibição efetiva de bactérias, permitindo a cicatrização adequada da ferida experimental. A curcumina pode oferecer um agente anti-placa mais econômico, menos citotóxico e acessível (SUKUMARAN; VADAKKEKUTTICAL; KANAKATH, 2020).

O presente trabalho apresentou resultados positivos e promissores da PHY em relação a CHX. Os derivados de PHY são compostos químicos amplamente estudados em aTFD, apresentando propriedade de se ligar a células de micro-organismos e, quando fotoativados, geram radicais tóxicos destruindo a membrana, as mitocôndrias ou os núcleos, promovendo dano e morte celular bacteriana (TRIGO-GUTIERREZ *et al*., 2018). PHY não ativados pela luz, de mesma origem do presente estudo, apresentam atividade antimicrobiana e antibiofilme (TEODORO *et al*., 2020; SANTOS *et al*., 2020). Assim como o amplo espectro de ação de CHX, a PHY apresenta ação antibacteriana contra uma série de micro-organismos, incluindo vírus. Quando incluídos em formulações para uso odontológico, PHY reduz 99,99% na contagem de bactérias e fungos, e revelam a porcentagem de 90% ou mais de inativação viral (ORCINA *et al*., 2021; SANTOS, C. *et al*., 2021).

Clinicamente, o enxaguatório de PHY 0,12% melhorou mais rapidamente os sintomas clínicos causados pelo coronavírus (ORCINA; SANTOS, 2021; SANTOS, P. *et al*., 2021). Nesse mesmo âmbito, PHY incorporada a formulação de dentifrício, reduziu significativamente a carga viral na cavidade oral do SARS-CoV-2 (POLETI *et al*., 2021). Na terapia periodontal de suporte, o dentifrício com PHY foi utilizado para auxílio no controle de formação de manchas em um paciente fumante, diminuindo a frequência do acúmulo e depósito de cálculo durante seis meses de acompanhamento (SANTOS; ZANGRANDO; VILHENA, 2021). Em todos esses estudos clínicos, nenhum efeito adverso de PHY foi relatado. Estudos laboratoriais demonstraram concentrações não-citotóxicas ou citotoxicidade moderada de PHY, conforme os resultados relatados nesse presente estudo, trazendo segurança para futuras investigações com essa classe de ftalocianinas (TEODORO *et al*., 2020; SANTOS, P. *et al*., 2021).

O ensaio de cicatrização de feridas revelou que PHY 0,0075% e PHY 0,12% não afetaram negativamente o fechamento da ferida experimental, pelo contrário, os resultados não apresentam diferenças estatísticas comparados ao controle positivo. O mecanismo que proporciona esse fato não foi elucidado no estudo e a literatura é escassa em trabalhos com essa classe de PHY. É sugerido que PHY pode beneficiar o processo de cicatrização pela capacidade dessa molécula gerar ROS quando ativada; essas são responsáveis por promover a proliferação celular através da ativação de células-tronco que regulam fatores inflamatórios e remodelação do colágeno, além de serem responsáveis por evitar o desenvolvimento de infecções inativando micro-organismos (VELLEJO *et al*., 2021).

Considerando que a PHY pode apresentar variadas formulações químicas em associação ou não com a aTFD, a comparação dos estudos e resultados entre si é bastante desafiadora devido principalmente as diferenças metodológicas e aplicação do composto. No entanto, o presente estudo apresenta resultados inéditos e com caráter promissor para o uso clínico da PHY. Considerando as limitações de um estudo *in vitro* e sabendo que PHY é segura clinicamente, sugere-se um estudo clínico randomizado comparando PHY com CHX, verificando assim seus benefícios antimicrobianos e possível potencial na melhora da cicatrização de feridas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A PHY apresentou-se menos citotóxica para fibroblastos NIH 3T3 comparado a CHX, através de dois ensaios para avaliação da viabilidade celular (MTT e CV). Além disso, as diferentes concentrações de PHY não interferiram negativamente na cicatrização de feridas experimentais. Já a CHX permitiu o fechamento apenas em concentrações menores.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BASSETTI, C.; KALLENBERGER, A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions: A histomorphometric study on experimental animals. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 7, n. 6, p. 443-456, dez. 1980.

BERNER, T. *et al*. Investigating the effect of antiseptic solution on the release of interleukin-6 and transforming growth factor beta 1 from human gingival fibroblasts using wound healing assays. **Journal of Oral Science**, v. 62, n. 3, p. 293-297, 2020.

BOISNIC, S. *et al*. L'effet cicatrisant d'Eludril® sur un modèle de muqueuse gingivale humaine. **Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale**, v. 107, n. 6, p. 431-435, dez. 2006.

BRECX, M. *et al*. Efficacy of Listerine®, Meridol® and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. **Journal of Clinical Periodontology**, [*S.l.*] v. 17, n. 5, p. 292-297, maio 1990.

CABRAL, C. T.; FERNANDES, M. H. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone–iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, n. 2, p. 155-164, jan. 2007.

CARMELLO, J. C. *et al*. In vivo photodynamic inactivation of Candida albicans using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415-422, jul. 2016.

CHANG, Y. *et al*. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 92, n. 4, p. 446-450, out. 2001.

CHARLES, C. H. *et al*. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 10, p. 878-884, out. 2004.

CHAVES, J. A. P. *et al*. Eletrocatálise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina tetracarboxilada de ferro. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 9-20, abr. 2003

CHEN, Z. *et al*. Photodynamic antimicrobial chemotherapy using zinc phthalocyanine derivatives in treatment of bacterial skin infection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 1, p. 018001, jan. 2016.

CHONDROS, P. *et al*. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 5, p. 681-688, set. 2009.

COELHO, A. S. *et al*. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. **Odontology**, v. 108, n. 2, p. 260-270, out. 2020.

CORBI, S. C. T. *et al*. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) effects using zinc tetracarboxy-phthalocyanine N-methylglucamine salt photosensitizer as an adjunct therapy in the treatment of induced periodontal disease in rats. **Lasers in Dental Science**, v. 4, n. 1, p. 43-52, mar. 2020.

DESMET, C. M. *et al*. Application of electron paramagnetic resonance (EPR) oximetry to monitor oxygen in wounds in diabetic models. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144914, dez. 2015.

DI PALMA, M. A. *et al*. Optimization of cellular uptake of zinc (II) 2, 9, 16, 23-tetrakis [4-(N-methylpyridyloxy)] phthalocyanine for maximal photoinactivation of Candida albicans. **Fungal Biology**, v. 117, n. 11-12, p. 744-751, nov./dez. 2013.

DOAN, L. *et al*. In vitro antiseptic effects on viability of neuronal and Schwann cells. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 37, n. 2, p. 131-138, mar. 2012.

DOGAN, S. *et al*. Effects of low-concentrated chlorhexidine on growth of Streptococcus sobrinus and primary human gingival fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v. 7, n. 4, p. 212-216, ago. 2003.

EISENBUD, D. E. Oxygen in wound healing: nutrient, antibiotic, signaling molecule, and therapeutic agent. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 3, p. 293-310, jul. 2012.

FLÖTRA, L. *et al*. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **European Journal of Oral Sciences**, v. 79, n. 2, p. 119-125, abr. 1971.

GARCIA, V. G. *et al*. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 12, p. 1106-1114, dez. 2011.

GIANNELLI, M. *et al*. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 2, p. 308-317, mar. 2008.

GKATZONIS, A. M. *et al*. A randomized controlled clinical trial on the effectiveness of three different mouthrinses (chlorhexidine with or without alcohol and C31G), adjunct to periodontal surgery, in early wound healing. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 7, p. 2581-2591, set. 2018.

HAMP, S.; ROSLING, B.; LINDHE, J. Effect of chlorhexidine on gingival wound healing in the dog. A histometric study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 2, n. 3, p. 143-152, set. 1975.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology in vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 271-276, ago./out. 2001.

HORTENSE, S. R. *et al*. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178-84, mai./ago. 2010.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, n. 10, p. 655-662, out. 1964.

ISLAM, M. M. *et al*. Association between sleep quality and duration and periodontal disease among university students: a cross-sectional study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 9, p. 3034, abr. 2020.

JAINCHILL, J. L.; AARONSON, S. A.; TODARO, G. J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. **Journal of virology**, v. 4, n. 5, p. 549-553, nov. 1969.

JESUS, P. C. C.; SAEKI, S. I. N.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1189-1198, dez. 2016.

KATSAROS, T. *et al*. Effect of different concentrations of commercially available mouthwashes on wound healing following periodontal surgery: a randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 10, p. 3587-3595, fev. 2020.

KO, A. *et al*. Photodynamic therapy of Porphyromonas gingivalis via liposome-encapsulated sensitizers. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 11, p. 827-830, nov. 2013.

KOZLOVSKY, A. *et al*. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 2, p. 164-171, fev. 2007.

LANGEBAEK, J.; BAY, L. The effect of chlorhexidine mouthrinse on healing after gingivectomy. **European Journal of Oral Sciences**, v. 84, n. 4, p. 224-228, ago. 1976.

LIU, J. X. *et al*. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. **Journal of Bone and Joint Infection**, Nova Iorque, v. 3, n. 4, p. 165-172, ago. 2018.

LÖE, H.; SCHIØTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v. 5, n. 2, p. 79-83, abr. 1970.

LONGO, J. P. F. *et al*. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 3, p. 575-584, ago. 2012.

LULIC, M. *et al*. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 8, p. 661-666, jul. 2009.

MADHUSUDANAN, S.; RENJITH, A. Comparative Evaluation of Cytotoxicity of 0.12% and 0.2% Chlorhexidine, 2% Povidone Iodine, 3% Hydrogen Peroxide and 0.9% Normal Saline Solutions on Fibroblasts-An Invitro Study. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 14, n. 9, set. 2020.

MARIOTTI, A. J.; RUMPF, D. A. H. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 12, p. 1443-1448, dez. 1999.

MORAES, M. *et al*. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 4, p. 592-597, dez. 2015.

MORAES, M. *et al*. Photodynamic therapy using chloro-aluminum phthalocyanine decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 208-215, fev. 2017.

MÜLLER, G.; KRAMER, A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1281-1287, jun. 2008.

NEWMAN, M. G. *et al*., **Carranza Periodontia Clínica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 880 p.

NYAMU, S. N. et al. Antimicrobial photodynamic activity of phthalocyanine derivatives. **Advances in Chemistry**, v. 2018, ID 2598062, mar. 2018.

ODILON, N. N. *et al*. Avaliação in vitro do efeito de dentifrícios branqueadores contendo blue covarine sobre o esmalte dentário bovino. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, p. 388-394, dez. 2018.

OK, E.; ADANIR, N.; HAKKI, S. Comparison of cytotoxicity of various concentrations origanum extract solution with 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite. **European Journal of Dentistry**, v. 9, n. 01, p. 006-010, jan./mar. 2015.

ORCINA, B. F. *et al*. Antibacterial and antifungal activity of intraoral products containing phthalocyanine: in vitro study. **Research Square**, 2021. No prelo. DOI 10.21203/rs.3.rs-1097185/v1. Disponível em: https://www.researchsquare.com/article/rs-1097185/v1. Acesso em: 16 ago. 2022.

ORCINA, B. F.; SANTOS, P. S. S. Oral manifestation COVID-19 and the rapid resolution of symptoms post-phtalox treatment: A case series. **Int. J. Odontostomat**, v. 15, n. 1, p. 67-70, mar. 2021.

OVERHOLSER, C. D. *et al*. Comparative effects of 2 mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, n. 8, p. 575-579, set. 1990.

PEGORARO, J. *et al*. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0, 12%. **J Oral Invest**, v. 3, n. 1, p. 33-37, 2014.

POLETI, M. L. *et al*. Toothbrushing with a dentifrice containing antimicrobial phthalocyanine derivative for the intraoral reduction of viral load of SARS-CoV-2: a pilot study. **Research Square**, 2021. No prelo. DOI https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-690819/v1. Disponível em: https://www.researchsquare.com/article/rs-690819/v1. Acesso em: 16 ago. 2022.

PRIMO, F. L. *et al*. Photobiostimulation on wound healing treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem

cell dermal equivalent. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 30, p. 5157-5163, out. 2012.

PUCHER, J. J.; DANIEL, C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 6, p. 526-532, jun. 1992.

REDDING, W. R.; BOOTH, L. C. Effects of Chlorhexidine Gluconate and Chlorous Acid-Chlorine Dioxide on Equine Fibroblasts and Staphylococcus aureus. **Veterinary Surgery**, v. 20, n. 5, p. 306-310, set. 1991.

RIBEIRO, A. P. D. *et al*. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 549-559, jun. 2013.

RICHARDS, D. Chlorhexidine mouthwash plaque levels and gingival health. **Evidence-based Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 37-38, jun. 2017.

RYSKOVA, L. *et al*. In vitro antimicrobial activity of light-activated phthalocyanines. **Open Life Sciences**, v. 8, n. 2, p. 168-177, dez. 2013.

SANTOS, C. A. *et al*. Antibiofilm Action of PHTALOX®-containing Oral Care Formulations. *In*: 2020 IADR/AADR/CADR General Session, 98., 2020, Washington. **Anais** [...]. Washington: IADR/AADR/CADR General Session, 2020. Trabalho 3326. Disponível em: https://iadr.abstractarchives.com/abstract/20iags-3314749/antibiofilm-action-of-phtalox-containing-oral-care-formulations. Acesso em: 29 ago. 2022.

SANTOS, C. A. *et al*. Virucidal activity of the antiseptic mouthwash and dental gel containing anionic phthalocyanine derivative: in vitro study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 13, p. 269, jun. 2021.

SANTOS, C. A.; ZANGRANDO M. S. R.; VILHENA, F. V. Adjuvant use of phthalocyanine derivative for calculus control. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 12, p. 101220-101221, mai. 2021.

SANTOS, P. S. S. *et al*. Beneficial effects of a mouthwash containing an antiviral phthalocyanine derivative on the length of hospital stay for COVID-19: randomised trial. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, out. 2021.

SAWADA, K. *et al*. Antiseptic solutions modulate the paracrine-like activity of bone chips: differential impact of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. 9, p. 883-891, ago. 2015.

SCHIÖSTT, C. R.; BRINER, W. W.; LÖUE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man: II. The effect on the salivary bacterial flora. **Journal of periodontal research**, v. 11, n. 3, p. 145-152, jun. 1976.

SCHLAFER, S. *et al*. The whitening effect of single brushing with blue-covarine containing toothpaste—A randomized controlled trial. **Journal of Dentistry**, v. 105, p. 103559, feb. 2021.

SCHMALZ, G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. **Clinical Oral Investigations**, v. 1, n. 4, p. 154-162, jan. 1998.

SCHMIDT, J. *et al*. Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells–an in vitro study. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 322-330, dez. 2016.

SEN, C. K. Wound healing essentials: let there be oxygen. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 1, p. 1-18, jan. 2009.

SENA, I. A. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy using a chloro-aluminum phthalocyanine adjuvant to nonsurgical periodontal treatment does not improve clinical parameters in patients with chronic periodontitis. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 37, n. 11, p. 729-735, nov. 2019.

SHAMEL, M.; AL-ANKILY, M. M.; BAKR, M. M. Influence of different types of whitening tooth pastes on the tooth color, enamel surface roughness and enamel morphology of human teeth. **F1000Research**, v. 8, out. 2019.

SIJARI, Z. *et al*. Effect of two post-surgical cleansing protocols on early periodontal wound healing and cytokine levels following osseous resective surgery: A randomized controlled study. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 17, n. 4, p. 300-308, mar. 2019.

SILVA, D. N. A. *et al*. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy with chloro-aluminum phthalocyanine on periodontal clinical parameters and salivary GSH and MDA levels in patients with periodontitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101843, set. 2020.

SILVA, J. C. E. *et al*. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 34, n. 5, p. 451-457, jun. 2004.

SPESIA, M. B.; DURANTINI, E. N. Photodynamic inactivation mechanism of Streptococcus mitis sensitized by zinc (II) 2, 9, 16, 23-tetrakis [2-(N, N, N-trimethylamino) ethoxy] phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, p. 179-187, ago. 2013.

SUKUMARAN, S. K.; VADAKKEKUTTICAL, R. J.; KANAKATH, H. Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 24, n. 2, p. 109, mar./abr. 2020.

TAO, D. *et al*. Tooth whitening evaluation of blue covarine containing toothpastes. **Journal of Dentistry**, v. 67, p. S20-S24, dez. 2017.

TARTAGLIA, G. M. *et al*. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 10, p. 1-16, set. 2019.

TEODORO, G. R *et al*. PHTALOX® antimicrobial action and cytotoxicity: in vitro study. *In*: 2020 IADR/AADR/CADR General Session, 98., 2020, Washington. **Anais** [...]. Washington: IADR/AADR/CADR General Session, 2020. Trabalho 0839. Disponível em: https://iadr.abstractarchives.com/abstract/20iags-3314903/phtalox-antimicrobial-action-and-cytotoxicity-in-vitro-study. Acesso em: 29 ago. 2022.

THOMAS, G. W. *et al*. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 66, n. 1, p. 82-91, ja. 2009.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. *et al*. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 212-219, dez. 2018.

TSOUROUNAKIS, I. *et al*. Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 8, p. 1211-1220, ago. 2013.

VALLEJO, M. C. S. *et al*. The role of porphyrinoid photosensitizers for skin wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4121, abr. 2021.

VAZ, V. T. P. *et al*. Whitening toothpaste containing activated charcoal, blue covarine, hydrogen peroxide or microbeads: which one is the most effective? **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, jan. 2019.

VILSINSKI, B. H. *et al*. Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 block copolymer micelles: photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 3, p. 518-525, mai./jun. 2015.

WESTFELT, E. Rationale of mechanical plaque control. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, n. 3, p. 263-267, mar. 1996.

WOOD, S. *et al*. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 50, n. 1, p. 1-7, mai. 1999.

WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA, M. *et al*. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 6, p. 1594-1600, abr. 2016.

YAYLI, N. Z. A. *et al*. Comparative evaluation of the cytotoxic effects of different oral antiseptics: a primary culture study. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 24, n. 3, p. 313, mar. 2021.

YOUNG, J. et al. Phototoxicity of liposomal Zn-and Al-phthalocyanine against cervical and oral squamous cell carcinoma cells in vitro. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 156, dez. 2016.

ZOLOTAREVA, J. O.; FARRAKHOVA, D. S.; LOSCHENOV, V. B. Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles Application for Fluorescent Diagnostics and Photodynamic Therapy in Dentistry. **KnE Energy**, p. 568–577-568–577, abr. 2018.