

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2021



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



Tatiane Miranda Manzoli

**Efeito fotodinâmico da curcumina em sistema precursor de cristal líquido
sobre a viabilidade de microrganismos presentes na saliva**

Araraquara

2019



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



Tatiane Miranda Manzoli

**Efeito fotodinâmico da curcumina em sistema precursor de cristal líquido
sobre a viabilidade de microrganismos presentes na saliva**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Dentística Restauradora.

Orientador: Prof^a Dr^a Livia Nordi Dovigo

Araraquara

2019

Manzoli, Tatiane Miranda

Efeito fotodinâmico da curcumina em sistema precursor de cristal líquido sobre a viabilidade de microrganismos presentes na saliva / Tatiane Miranda Manzoli. -- Araraquara: [s.n.], 2019

65 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Renato Parsekian Martins

1. Curcumina 2. Fotoquimioterapia 3. Saliva. I.Título

Tatiane Miranda Manzoli

**Efeito fotodinâmico da curcumina em sistema precursor de cristal líquido
sobre a viabilidade de microrganismos presentes na saliva**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Prof^aDr^a Lívia Nordi Dovigo

Prof^a Dr^a Andrea Abi Rached Dantas

Prof.Dr. Elídio Rodrigues Neto

Araraquara, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Tatiane Miranda Manzoli

NASCIMENTO: 19/06/1993 – Cacoal/Ro

FILIAÇÃO: Luzenir Rosa Miranda Manzoli
Valdemir Manzoli

| | |
|--------------------|--|
| 2011-2015 | Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal |
| 2014-2014 | Aperfeiçoamento em Estética Dental na Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal |
| 2016-2016 | Aperfeiçoamento em Dentística Restauradora na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”- UNESP |
| 2016-2018 | Especialização em Dentística Restauradora na Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia- FAEPO |
| 2017-2019 | Mestrado em Ciências Odontológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”- UNESP |
| Associações | CROSP – Conselho Regional de Odontologia do São Paulo SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica |

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Luzenir** e **Valdemir**, por todo apoio, amor e confiança. Obrigada por serem meu alicerce em todos os momentos da vida, sempre acreditando que eu seria capaz.

Ao meu irmão **Lucas**, que mesmo com a distância mostrava-se presente sendo sempre meu amigo.

Ao meu namorado e amigo **Gerson**, que foi de grande importância, ajudando de forma direta e indireta na conclusão do trabalho. Obrigada por sempre acreditar que eu conseguiria e não deixar que eu desanimasse.

E a **todos** que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/Araraquara, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e de seu Vice Diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora, na função de Chefe do Departamento Profa. Dra. **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru** e de seu Vice-Chefe Prof. Dr. **Milton Carlos Kuga**.

Ao Departamento de Odontologia Social, na função de Chefe do Departamento Prof. Dr. **Oscar Fernando Muñoz Chávez** e de sua Vice-Chefe Profa. Dra. **Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, na função de Chefe do Departamento Prof. Dr. **João Neudenir Arioli Filho** e de seu Vice-Chefe Prof. Dr. **Francisco de Assis Mollo Junior**.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Lívia Nordi Dovigo**, pela oportunidade da realização desse trabalho, estando sempre pronta a ajudar. Obrigada pela confiança e paciência. Agradeço pelo tempo dedicado, ensinamentos que não mediu esforços para compartilhar e por sempre ajudar com carinho e respeito.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciência Odontológica, em especial aos professores **Edson Alves de Campos** e **Marcelo Ferrarezi de Andrade**, por toda oportunidade e pelos ensinamentos, dando total apoio e incentivo na prática odontológica; à professora **Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**, por ser um exemplo de profissional e ser humano; aos demais **professores**, por todo conhecimento transmitido durante o curso de Mestrado, e pela convivência agradável no dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. **Marlus Chorili** da faculdade de farmácia, responsável pela colaboração no trabalho com as formulações dos fármacos utilizados. Junto a ele agradeço a **Francesca**, **Daniela** e a **Giovana**, que trabalharam em conjunto com nosso grupo de pesquisa, sempre muito responsáveis e comprometidas.

À Dra. **Paula Aboud Barbugli** assistente de suporte acadêmico, que ajudou na análise de microscopia do trabalho. Obrigada por toda ajuda e competência no trabalho realizado.

À técnica de laboratório, **Bruna Michelli Novelli**, que ajudou na elaboração desse trabalho sempre de forma alegre e prestativa, se tornando uma amiga.

Aos **voluntários** da pesquisa, muito obrigada pela compreensão e por terem ajudado para que esse trabalho fosse realizado.

Aos **funcionários** da faculdade, por serem sempre prestativos e atenciosos. Em especial as secretárias **Creusa Maria Hortenci, Neli Sandra Aparecida de Oliveira Parreira e Glaucia Cristina Figueira Merlos.**

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por colocar sempre pessoas maravilhosas no meu caminho e a me ajudar em todos os momentos da vida.

Aos meus **pais**, por sempre fazerem o possível e impossível para a realização dos meus sonhos e do meu irmão. Eu amo vocês.

Aos meus **familiares**, que mesmo de longe estavam torcendo para que tudo ocorresse bem e entenderam meus momentos de ausência.

Ao **Gerson**, uma pessoa admirável que apareceu em minha vida para acrescentar de forma positiva em todos os aspectos.

Aos meus amigos **Eran, Joatan, Rodrigo, João, Diego, Aryvelto, Ricardo, Camila, Eduardo e Hadyla**, por todos os momentos compartilhados. Obrigada por terem sido uma família para mim em Araraquara.

“A jornada de mil quilômetros começa com o primeiro passo.”

(O Rei Leão)

Manzoli TM. Efeito fotodinâmico da curcumina em sistema precursor de cristal líquido sobre a viabilidade de microrganismos presentes na saliva [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Na saliva humana é possível identificar a presença de diversas espécies constituintes do microbioma oral. De forma geral, as bactérias presentes na saliva em estado planctônico podem ou não ser agentes causais diretos das doenças, sendo o desequilíbrio microbiano apontado como principal fator a permitir que bactérias mais virulentas se tornem dominantes e desencadeiem patologias. Com o intuito preventivo ou de tratamento diversas formas de tentar conter ou eliminar os microrganismos têm surgido. Uma nova técnica que vem sendo investigada é a Inativação Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Inactivation, PDI), cujo mecanismo de ação envolve a utilização de um fotossensibilizador (FS), sua iluminação com uma fonte de luz de comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do FS e a presença de oxigênio. A Curcumina (CUR) vem sendo apontada como potencial FS e diversos estudos vêm propondo alternativas farmacológicas para sua veiculação. O objetivo geral desse estudo foi investigar o efeito antimicrobiano da PDI utilizando a CUR em um sistema precursor de cristal líquido (CL) sobre amostras de saliva humana. Tratou-se de estudo experimental laboratorial no qual diferentes indivíduos forneceram amostras de saliva não estimulada, sendo então as amostras de saliva distribuídas aleatoriamente em diferentes grupos. Como variáveis de desfecho tem-se o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), avaliadas em quatro diferentes meios de cultura para identificação presuntiva de espécies selecionadas. Como variáveis independentes têm-se o tratamento (i. PDI: Inativação Fotodinâmica; ii. CUR: Apenas Curcumina; iii. Controle: Apenas o veículo das formulações) e formulação (i. CL: sistema precursor de cristal líquido; ii. DMSO (dimetilsulfóxido): DMSO a 10%). O cruzamento dessas variáveis deu origem a seis grupos experimentais. Após os tratamentos, foi realizada a quantificação de células viáveis em cada amostra por meio da semeadura em quatro meios de cultura: Mitis Salivarius para identificação presuntiva de streptococcus do grupo mutans, Man, Rogosa e Sharpe para identificação presuntiva de *L. casei* e outras espécies acidófilas, Chromagar *Candida* para identificação presuntiva de *Candida* spp e Müller Hinton não específico para promover crescimento de microbiota total. Foi verificado que, para os quatro meios de cultura, as reduções microbianas observadas pelo efeito dos diferentes tratamentos e formulações sobre o \log_{10} UFC/mL não foram estatisticamente significativas. Portanto, não foi observado efeito fotodinâmico com a utilização da CUR nas condições experimentais utilizadas.

Palavras – chave: Curcumina. Fotoquimioterapia. Saliva.

Manzoli TM. Photodynamic effect of curcumin in a liquid crystal precursor system on the viability of microorganisms present in saliva [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

It is possible to identify the presence of several constituent species of the oral microbiome in human saliva. Generally, bacteria present in saliva in planktonic state could be responsible agents of the diseases, and the microbial imbalance is indicated as the main factor to allow more virulent bacteria to become dominant and to trigger pathologies. In order to prevent or treat, many ways of trying to contain or eliminate microorganisms have arisen. A new technique that has been investigated is the Photodynamic Inactivation (PDI), whose mechanism of action involves the use of a photosensitizer (FS), its illumination with a light source of wavelength compatible with the spectrum of absorption of FS and the presence of oxygen. Curcumin (CUR) has been identified as a potential FS and several studies have proposed pharmacological alternatives for its use. The general objective of this study was to investigate the antimicrobial effect of PDI using CUR in a liquid crystal precursor (CL) system on samples of human saliva. This was an experimental laboratory study in which different individuals provided samples of non-stimulated saliva, and the saliva samples were randomly distributed in different groups. As outcome variables, the number of colony forming units per milliliter (CFU/mL) evaluated in four different culture media for presumptive identification of selected species was used. As independent variables are the treatment (i PDI: Photodynamic Inactivation; ii CUR: curcumin only; iii Control: only the vehicle of the formulations) and formulation (i.CL: liquid crystal precursor system; ii DMSO: 10% DMSO). The crossing of these variables gave rise to six experimental groups. After the treatments, quantification of viable cells in each sample by sowing in four culture media: Mitis Salivarius for presumptive identification of mutans, Man, Rogosa and Sharpe streptococcus for presumptive identification of *L. casei* and other species acidophilus, Chromagar Candida for presumptive identification of *Candida* spp and Müller Hinton not specific to promote total microbiota growth. It was found that for the four culture media, the microbial reductions observed by the effect of different treatments and formulations on \log_{10} CFU/mL were not statistically significant. Therefore, no photodynamic effect was observed with the use of CUR in the experimental conditions used.

Keywords: Curcumin. Photochemotherapy. Saliva.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 15 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 3.1 Antimicrobianos | 16 |
| 3.2 Patologias Bucais e Mircroorganismos..... | 21 |
| 3.3 Saliva | 23 |
| 3.4 Inativação Fotodinâmica..... | 25 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO | 34 |
| 4.1 Delineamento Experimental | 34 |
| 4.2 Seleção dos Participantes | 34 |
| 4.3 Aquisição das Amostras de Saliva | 35 |
| 4.4 Fotossensibilizadores e Fonte de Luz | 36 |
| 4.5 Protocolos de Tratamentos e Quantificação Microbiológica .. | 36 |
| 4.6 Análise em Microscopia de Fluorescência | 40 |
| 4.7 Estudo Piloto para Calibração do Pesquisador | 41 |
| 4.8 Análise Estatística | 41 |
| 5 RESULTADO | 43 |
| 6 DISCUSSÃO | 49 |
| 7 CONCLUSÃO | 52 |
| REFERÊNCIAS | 53 |
| ANEXO | 59 |

1 INTRODUÇÃO

A saliva é uma secreção exócrina mucoserosa produzida por diferentes glândulas salivares, sendo o principal fluido da cavidade bucal. Depois da água, seus principais componentes orgânicos e minerais são proteínas, sódio, potássio, cloro e bicarbonato. Há também presença de várias enzimas hidrolíticas destinadas à degradação de componentes alimentares. As fosfoproteínas, glicoproteínas ácidas, básicas e mucinas possuem múltiplas funções, mas talvez o principal papel fisiológico seja a proteção dos tecidos contra agressões, por meio da cobertura orgânica de superfícies mucosas e dos dentes^{1,2}. Além da lubrificação de mucosas, a proteção salivar também se deve à formação de uma biopelícula pela adesão de proteínas e glicoproteínas salivares e do fluido gengival na superfície dentária. Denominada de película adquirida, ela protege o dente fazendo com que ocorra uma diminuição nas taxas de difusão de fosfato e íons de cálcio em condições ácidas, evitando assim com que ocorra a desmineralização do esmalte e remineralização dos tecidos dentais após desmineralização³.

Na saliva é possível identificar a presença de diversas espécies constituintes do microbioma oral e outras transitórias que estão presentes por curtos períodos de tempo⁴. A microbiota presente na saliva já vem sendo estudada há anos com relação a sua composição e proporção, com destaque para gêneros potencialmente patogênicos como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Candida*⁵⁻⁷. Atualmente sabe-se que o microbioma oral é composto por mais de 700 espécies⁸ que podem estar predominantemente em diferentes habitats como mucosas, sulcos e tecidos duros, cada um deles com condições micro ambientais específicas⁹. Também já foi sugerido que a composição da microbiota salivar pode estar relacionada com os níveis de experiência que o indivíduo teve com as doenças bucais e que, portanto, existem diferenças nos perfis bacterianos salivares em pacientes com e sem patologias bucais⁴.

O aprimoramento das técnicas de biologia molecular acompanhado do maior conhecimento da grande diversidade existente no microbioma salivar humano tem auxiliado na melhor compreensão do papel que este desempenha na saúde e na doença humana¹⁰. De forma geral, as bactérias presentes na saliva em estado planctônico podem ou não ser agentes causais diretos das doenças, sendo o desequilíbrio microbiano apontado como principal fator a permitir que bactérias mais virulentas se tornem dominantes e desencadeiem patologias^{11,12}. Além disso, alguns microrganismos possuem capacidade de colonizar estruturas dentais e protéticas por meio da formação de biofilme, o qual também é fortemente relacionado à presença de patologias bucais^{9,13-15}. A cárie é uma doença multifatorial e infecciosa, de caráter crônico que acomete grande parte da população e é uma das maiores causas de perda dentária¹⁶⁻¹⁸. Ela ocorre por meio de um processo físico-químico dinâmico que leva à desmineralização do esmalte dental após a formação de ácidos orgânicos pelos microrganismos

presentes no biofilme dental^{17,19}. As espécies *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* spp. e *Lactobacillus* spp são consideradas as principais responsáveis pelo surgimento da lesão, embora atualmente exista uma lista extensa de outros gêneros microbianos associados^{12,11,18,20-22}. Outro microrganismo que merece destaque é a *Candida albicans*, principal espécie fúngica presente na microbiota oral de indivíduos saudáveis que, em pacientes imunocomprometidos, pode gerar uma infecção grave²³. As formas que a *Candida* pode levar o indivíduo a ter uma patologia são por meio de destruição tecidual com ação de enzimas proteolíticas ou com a produção de toxinas levando a uma resposta²⁴. A candidíase orofaríngea é uma infecção fúngica e oportunista com elevada morbidade e mortalidade^{23,25}. Apesar da *Candida albicans* ser a espécie mais prevalente, outras espécies, como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* vem sendo associadas a infecções bucais²⁵.

Com o intuito preventivo ou de tratamento das patologias, diversas formas de tentar conter ou eliminar os microrganismos têm surgido. Tratamentos mais tradicionais como a remoção mecânica do biofilme não têm sido suficientes, pois em casos de tratamento endodôntico por exemplo, onde a anatomia radicular é complexa, deve-se utilizar o auxílio de medicações antimicrobianas²⁶. Clinicamente, utilizam-se agentes antimicrobianos como clorexidina e o triclosan, os quais possuem propriedades como substantividade, baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais²⁷⁻³⁰. Porém o uso prolongado de antimicrobianos como a clorexidina, pode gerar alteração no paladar, descamação da mucosa oral, coloração dos materiais restauradores e dentes³¹. Atualmente, alguns estudos vêm mostrando que apesar de sua eficiência clínica, o uso prolongado desses antimicrobianos pode gerar resistência nos microrganismos bucais^{30,32-36}.

Uma nova técnica que vem sendo fonte de muitos estudos é a Inativação Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Inactivation, PDI), cujo mecanismo de ação envolve a utilização de um fotossensibilizador (FS), sua iluminação com uma fonte de luz de comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do FS e a presença de oxigênio^{31,35-38}. A morte celular ocasionada pela ação da PDI ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio que podem ser geradas por meio de dois tipos de reações: a primeira (reação do tipo I) gera radicais livres e a segunda (reação do tipo II) gera oxigênio singleto, sendo que ambos os caminhos levam à oxidação de biomoléculas e morte celular^{37,39-42}. As principais vantagens da utilização da PDI são a aplicação apenas no local afetado, pouca alteração da flora bucal e o improvável desenvolvimento de resistência nos microrganismos^{40,41}. Esse tratamento tem se provado eficaz contra bactérias, fungos, vírus e protozoários^{26,40} e portanto, vem se mostrando uma técnica promissora em aplicação em bolsas periodontais, lesões de cárie, canais radiculares e descontaminação prévia a cirurgias^{31, 37,43}.

O FS tem papel importante no processo fotodinâmico e deve apresentar propriedades como solubilidade e estabilidade em solução aquosa e pH fisiológico, seletividade, habilidade de transporte

intracelular, possuir rendimento quântico, não ser tóxico a níveis terapêuticos, apresentar capacidade de absorção de luz e ser metabolizado rapidamente⁴¹. Recentemente, diversos FS têm sido usados em pesquisas e mostrado eficácia com a utilização na PDI, como Azul de toluidina, TMPyP, Clorina-e6, fulereno C60 e SAPYR³⁵. Estudos atuais mostraram que a Curcumina (CUR), um composto fenólico extraído dos rizomas da *Cúrcuma longa* (açafraão-da-índia), tem uma forte absorção de luz na região da janela terapêutica, além de vantagens como seu efeito anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antitumoral^{31,45-48}. Apesar de suas inúmeras vantagens, esse FS apresenta insolubilidade em soluções aquosas e uma alta taxa de fotodegradação na presença de luz⁴¹.

Diante do potencial da CUR e, buscando viabilizar suas aplicações clínicas, diversos estudos vêm propondo alternativas farmacológicas para sua veiculação uma vez que os veículos já utilizados (DMSO e etanol) podem apresentar toxicidade nos tecidos da cavidade bucal⁴⁹⁻⁵². Desenvolveu-se uma gama diversa de novas preparações, nas quais a CUR é encapsulada em nanolipossomas, nanopartículas, microesferas, micro emulsões, dispersões sólidas, dendrímeros e dímeros, entre outros⁵³. Os sistemas precursores de cristal líquido (CL) são considerados estruturas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas, os quais parecem ser uma excelente matriz de liberação de fármacos. Esses sistemas podem incorporar água presente na saliva para promover mudanças estruturais e resultar em uma fase cristalina líquida que pode otimizar a eficiência da CUR^{51,55}. Assim, uma alternativa que já vem sendo proposta na literatura é a incorporação da CUR em um sistema de CL, o qual tem mostrado vantagens como solubilização, estabilidade e biodisponibilidade do fármaco, além de apresentar toxicidade reduzida, estabilidade termodinâmica e uma aderência dérmica satisfatória^{54,56-58}. A CUR em formulação de CL com a adição de dispersões poliméricas, se comparado à solução padrão de CUR tem se mostrado mais potente, além disso, a presença de poloxâmero faz com que ocorra a geleificação do fármaco, facilitando assim sua aplicação local⁵⁵. No entanto, o efeito desse tipo de sistema sobre microrganismos bucais ainda é pouco conhecido, necessitando de pesquisas mais específicas para a área da odontologia.

7 CONCLUSÃO

Em face dos objetivos desta pesquisa e dos resultados obtidos e, considerando ainda as limitações desse estudo, pode-se concluir que:

1. Quando a CUR foi avaliada no sistema CL (grupo PDI-CL), obteve-se reduções microbianas médias de 0,03; 0,15; 0,28 e 0,66 log para os meios de cultura Chomagar *Candida*, Mitis Salivarius, Man Rogosa Sharpe e Muller Hinton, respectivamente.

2. Após utilização da CUR em DMSO 10% (grupo PDI-DMSO), atingiram-se reduções de 0,14; 0,61; 0,85 e 0,78 log para os mesmos meios.

3. Para os quatro meios de cultura, as reduções microbianas observadas pelo efeito dos diferentes tratamentos e formulações sobre o \log_{10} UFC/mL não foram estatisticamente significativas. Portanto, não foi observado efeito fotodinâmico com a utilização da CUR nas condições experimentais utilizadas.

REFERENCIAS*

1. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1110-8.
2. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: a review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(6): 863-74.
3. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(6): 631-8
4. Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn NE, Nikolai K, Alexis K, Bruce JP, et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1270614.
5. Ross PW. Quantitative studies on the salivary flora *J. clin. Pathol.*, 1971; 24(8): 717-720.
6. Epstein JB, Chin EA, Jacobson JJ, Rishiraj B, Le N. The relationships among fluoride, cariogenic oral flora and salivary flow rate during radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 86(3): 286-92.
7. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(3): 175-81.
8. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. *msystems.* 2018 4; 3(6). pii: e00187-18.
9. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dent Clin North Am.* 2017; 61(2): 199-215.
10. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009; 19(4): 636-43.
11. Larsen T, Fiehn NE . Dental biofilm infections - an update. *APMIS.* 2017; 125 (4): 376-84.
12. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015; 23(2): 76-82.
13. Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N. In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches. In: Mendez-Vilas A, Diaz J, editors. *Microscopy: science, technology, applications and education.* Badajoz: Formartex; 2010. p. 597-606.
14. March PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 7-15.
15. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the hisayama study. *Sci Rep.* 2016; 6: 22164.
16. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004 ; 32(5): 319-21.
17. Leites ACBR, Pinto MB, Souza ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita.* 2006; 25(2): 135-48.
18. Yadav K, Prakash S. Dental caries: a microbiological approach. *J Clin Infect Dis Pract.* 2017; 2(1): 1-15.

19. World Health Organization (WHO). Sugars and dental caries. [acesso em 07 Jan 2019]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259413/WHO-NMH-NHD-17.12-eng.pdf?sequence=1>.
20. Bowden GH. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997; 25(1): 76-81.
21. Amaral GS, Negrini T, Maltz M, Arthur RA. Restorative materials containing antimicrobial agents: is there evidence for their antimicrobial and anticaries effects? A systematic review. *Aust Dent J.* 2016; 61(1): 6-15.
22. Colombo NH, Kreling PF, Ribas LFF, Pereira JA, Kressirer CA, Klein MI, et al. Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol.* 2017; 83: 282-288.
23. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
24. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 61-9.
25. Terças AL, Marques SG, Moffa EB, Alves MB, de Azevedo CM, Siqueira WL, et al. Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. *Front Microbiol.* 2017; 2(8): 298.
26. Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J.* 2014; 9(3): 161-8.
27. Jenkin S, Addy M, Newcombe RG. Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *Journal of Clinical Periodontology.* 1994; 21: 250-255.
28. Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Efeitos dos enxertos antissépticos orais tópicos nas contagens bacterianas de saliva em indivíduos saudáveis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 118 (5): 625-9.
29. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(11): 965-74.
30. Hortense SR, Carvalho ES, Carvalho FS, Silva RPR, Bastos JRM, Bastos RS. Uso da Clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 2010; 22(2): 178– 84.
31. Kellesarian SV, Qayyum F, de Freitas PC, Akram Z, Javed F. A terapia fotodinâmica antimicrobiana é um protocolo terapêutico útil para a descontaminação oral? Uma revisão sistemática e meta-análise. *Fotodiagnóstico PhotodynTher.* 2017; 20: 55-61.
32. Abouassi T, Hannig C, Mahncke K, Karygianni L, Wolkewitz M, Hellwig E, et al. Does human saliva decrease the antimicrobial activity of chlorhexidine against oral bacteria?. *BMC Res Notes.* 2014; 7:711.
33. Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, Ainsworth AJ, Patrick C, Martin MS, et al. Mupirocin and chlorhexidine resistance in staphylococcus aureus in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrobial Agent Chemother.* 2013; 57(1): 559-568.
34. Palmer NO. Antibiotic prescribing in general dental practice. *Prim Dent J.* 2014; 3(1): 52-7.
35. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol.* 2018; 44(5): 571-589.

36. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(2): 49-55.
37. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55 :143-66.
38. Rolim JPML, de-Melo MAS, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NAP, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2012; 106: 40-6.
39. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras*. 1996; 42: 229-36.
40. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 13-28.
41. Bagnato C, Prados MB, Franchini GR, Scaglia N, Miranda SE, Beligni MV. Analysis of triglyceride synthesis unveils a green algal soluble diacyl glycerolacyl transferase and provides clues to potential enzymatic components of the chloroplast pathway. *BMC Genomics*. 2017; 9; 18(1): 223.
42. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145: 477-89.
43. Santezi C, Tanomaru JM, Bagnato VS, Júnior OB, Dovigo LN. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiagnosis PhotodynTher*. 2016; 15: 46-52.
44. Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions-a systematic review. *Photodiagnosis PhotodynTher*. 2017; 18: 54-62.
45. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 2010; 103 (11): 1545-57.
46. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal câncer. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52 (9): 1040-61.
47. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9):927-34.
48. Volp ACP, Renhe IRT, Stringueta PC. Pigmentos naturais bioativos. *Alim Nutr*. 2009; 20(1): 157-66.
49. de Freitas ES, da Silva PB, Chorilli M, Batista AA, Lopes EO, da Silva MM, et al. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium (II) Compounds. *Molecules*. 2014; 19: 5999-6008.
50. Shen LH, Ji F, Zhang HY. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. *Chem Phys Lett*. 2005; 409: 300-3.
51. Carvalho DM. Avaliação da solubilidade da curcumina e caracterização de filme ativo incorporado com nano suspensão de curcumina (Dissertação de Mestrado). Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.

52. Alves AO. Avaliação da eficiência do diodo emissor de luz (LED) emitindo em 460 nm associado à curcumina na fotossensibilização letal de *Candida albicans* e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (Dissertação de Mestrado). Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG; 2011.
53. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat*. 2014; 46(1): 2-18.
54. Carvalho FC, Sarmento VH, Chiavacci LA, Barbi MS, Gremião MP. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. *J PharmSci*. 2010; 99(5): 2367-74.
55. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine*. 2015; 30;10: 4815-24.
56. Anwar M, Asfer M, Prajapati AP, Mohapatra S, Akhter S, Ali A, et al. Synthesis and in vitro localization study of curcumin-loaded SPIONs in a micro capillary for simulating a targeted drug delivery system. *Int J Pharm*. 2014; 1; 468(1-2): 158-64.
57. Hamam F, Al-Remawi M. Novel delivery system of curcumin through transdermal route using sub-micronized particles composed of mesoporous silica and oleic acid. *J Funct Foods* 2014; 8: 87-99.
58. Victorelli FD. Sistemas líquidos cristalinos a base de quitosana e polietilenoimina para a administração cutânea de metronidazol (Trabalho de Conclusão de Curso). [acesso 2018 Dec 8]. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/140210>>.
59. Loesche WJ. Antimicrobials in dentistry: with knowledge comes responsibility. *J Dent Res*. 1996; 75(7): 1432-3.
60. Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C. Efeitos dos enxertos antissépticos orais tópicos nas contagens bacterianas de saliva em indivíduos saudáveis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118 (5): 625-9.
61. Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, et al. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *J Food Chem*. 2010; 119(4): 1346-51.
62. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J. Dent*. 2010; 38 Suppl 1:S11-5.
63. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J. Dent*. 2010; 38 Suppl 1:S6-10.
64. Palmer NO. Antibiotic prescribing in general dental practice. *Prim Dent J*. 2014; 3(1): 52-7.
65. Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J*. 2014; 9(3): 161-8.
66. Abouassi T, Hannig C, Mahncke K, Karygianni L, Wolkewitz M, Hellwig E, et al. Does human saliva decrease the antimicrobial activity of chlorhexidine against oral bacteria?. *BMC Res Notes*. 2014; 7: 711.
67. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nano medicine*. 2015; 30;10: 4815-24.
68. do Amaral GS, Negrini T, Maltz M, Arthur RA. Restorative materials containing antimicrobial agents: is there evidence for their antimicrobial and anticaries effects? A systematic review. *Aust Dent J*. 2016; 61 (1): 6-15.

69. Palmer NOA. Antimicrobial resistance and antibiotic prescribing in dental practice. *dent update*. 2016; 43(10): 954-58, 960.
70. Featherstone JD, Fontana M, Wolff M. Novel anticaries and remineralization agents: future research needs. *J Dent Res*. 2018; 97(2): 125-7.
71. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad med J*. 2002; 78(992): 455-9.
72. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 199-215.
73. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *APMIS*. 2017; 125 (4): 376-384.
74. Colombo NH, Krelinga PF, Ribas LFF, Pereira JA, Kressirerb CA, Kleind MI, et al. Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol*. 2017; 83: 282-288.
75. Couto JAM, Lopes FF. The influence of age in the speed of salivary flow in adults. *RFO*. 2010; 15(2): 135-38.
76. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: a review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(6): 863-74.
77. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the hisayama study. *Sci Rep*. 2016; 6: 22164.
78. Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med Sci*. 1994; 9(2): 105-09.
79. Nitzan Y, Balzam-Sudakevitz A, Ashkenazi H. Eradication of *acinetobacterbaumannii* by photosensitized agents in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1998; 42(3): 211-8.
80. Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 4; 79(1): 51-7.
81. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87 (4): 895-903.
82. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
83. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30(2): 96-101.
84. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30(7): 393-9
85. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers MedSci*. 2013; 28(2): 391-8.
86. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10(3): 313-9.

87. Leite DPV, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(11): 627-32.
88. Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2015; 1; 16(1): 1-6.
89. Santezi C, Tanomarua JM, Bagnato VS, Júnior OB, Dovigo LN. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiagnosis and Photodynamic Ther.* 2016; 15: 46-52.
90. Panhóca VH, Esteban FL, Corrêa TQ, Paolillo FR, de Souza CW, Bagnato VS. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. *Photomed Laser Surg.* 2016; 34(9): 411-7.
91. Donato HAR, Pratavieira S, Grecco C, Brugnera-Júnior A, Bagnato VS, Kurachi C. Clinical comparison of two photosensitizers for oral cavity decontamination. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35(2): 105-110.
92. García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *plos one.* 2013; 8 (12): e83522.
93. Zanin ICJ, Brugnera A, Hoefling JF, Zanin FAA, Goncalves RB. Antimicrobial effect of low-level laser therapy in the presence of photosensitizer on human saliva bacteria. *Proceedings of SPIE. International Symposium in Biomedical Optics*; 2002; San Jose, CA. 4610. [acesso 8 dez]. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.469319>.
94. Salimetrics. SalivaBio. Saliva collection and handling advice. 2011. [acesso em 17/08/2017. Disponível em: www.salimetrics.com
95. Fisher RA. Intraclass correlations on the analysis of variance. In: Fisher RA. *Statistical methods for research workers.* 14th ed. Edinburg: Oliver and Boyd; 1970. p. 213-49.
96. Graw MC, Kenneth O, Wong SP. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. *Psychol Methods.* 1996; 1(1): 30-46.
97. Fermanian J. Measure de l'accord entre deuxjuges: casquantitatif. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 1984; 32(6): 408-13.