



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



Diego Dantas Lopes dos Santos

**Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127
sobre biofilme de *Streptococcus mutans***

Araraquara

2019



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



Diego Dantas Lopes dos Santos

**Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127
sobre biofilme de *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli.

Araraquara

2019

Santos, Diego Dantas Lopes dos
Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina
conjugada a Pluronic® F-127 sobre biofilme de
Streptococcus mutans / Diego Dantas Lopes dos Santos. --
Araraquara: [s.n.], 2019
81 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza
Rastelli

1. Curcumina 2. Micelas 3. Fotoquimioterapia
4. Biofilmes 5. Streptococcus mutans I. Título

Diego Dantas Lopes dos Santos

**Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127
sobre biofilme de *Streptococcus mutans***

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge

3º Examinador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, 4 de março de 2019.

DADOS CURRICULARES

Diego Dantas Lopes dos Santos

NASCIMENTO: 14 de junho de 1992 – São Caetano do Sul – São Paulo.

FILIAÇÃO: Raimundo Nonato Lopes dos Santos.
Carmelita Soares de Carvalho Dantas dos Santos.

2012 a 2017: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade Integral Diferencial – FACID/ DEVRY.

2017 a 2019: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, na Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr.

Dedico esse trabalho...

Aos meus amados pais **Raimundo Nonato Lopes dos Santos** e **Carmelita Soares de Carvalho Dantas dos Santos**, que nunca mediram esforços para me ajudar a alcançar meus sonhos e objetivos desde criança. Vocês são símbolos de trabalho, dedicação, competência e superação. Sempre fizeram o possível e o impossível para ajudar nos meus estudos, na minha educação. Sempre mostrando a importância dos estudos e educação na minha vida e o que ambas iriam me proporcionar. Obrigado por terem me criado com muito carinho e amor. Obrigado também por sempre me protegerem e por terem guiado meus passos nessa longa jornada até hoje. Vocês são meus maiores incentivadores e apoiadores das minhas decisões, desde quando sai de casa para fazer o ensino médio e também quando resolvi morar longe de Teresina, longe de todos, para fazer o Mestrado. Vocês são minha base, meus alicerces e sempre me motivaram e vibraram em cada vitória e cada conquista, como também me consolaram e orientaram diante das dificuldades. Sem vocês dois eu não teria chegado aonde cheguei hoje, essa conquista é nossa! Minha admiração por vocês sempre será grandiosa e eterna. Pai e Mãe, amo incondicionalmente vocês!

Aos **meus avós maternos**, obrigado pelo incentivo constante, por toda a torcida e vibração nessa longa jornada que decidi seguir. A experiência de vocês com suas palavras positivas sempre me motivou e impulsionou a alcançar meus objetivos e sonhos! Agradeço pelo carinho e o imenso amor transmitido sempre nos momentos que estamos juntos. Amo muito vocês!

Aos **meus avós paternos** (*in memoriam*), que apesar de não ter tido tanto contato como eu queria, eu sei que de onde estiverem sempre estarão mandando forças positivas e muito amor.

À **Deus**, por ter guiado nas minhas escolhas trilhando meu caminho e por ter me dado muita força para superar os mais variados obstáculos ao decorrer desse mestrado. Agradeço por ter me dado o dom da vida e por me proporcionar paz, saúde, alegrias, conquistas, proteção, amigos e uma família maravilhosa que tenho. Agradeço por todas as vitórias que tive pois sem o Senhor ao meu lado eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, representada pelos meus **tios, tias e primos** por transmitir o imenso carinho, amor e torcida contínua para que eu pudesse acreditar em meus sonhos e correr atrás deles. Quero agradecer especialmente ao Tio **Temistocles de Sá Bezerra Filho** e a Tia **Maria Diomar Barbosa Bezerra** por todo apoio quando cheguei em São Paulo.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Alessandra Nara de Souza Rastelli** por ser sinônimo de dedicação e trabalho! Com muita luta e persistência conseguiu montar o **Laboratório de Biofotônica e Bionanomateriais** do Departamento de Odontologia Restauradora. Perdi as contas de quantos finais de semana e feriados passei nesse laboratório para concluir a pesquisa desse Mestrado. Tenho muito orgulho de ter participado dos primeiros projetos lá desenvolvidos. Muito obrigado pelo respeito e confiança depositada no meu trabalho, pelos ensinamentos transmitidos e, acima de tudo, pela paciência.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, na presença de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini** e Vice-Reitor **Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)** da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa da sua Diretora **Prof^a. Dr^a Elaine Maria Sgavioli Massucato** e de seu vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pela oportunidade de crescimento profissional concedida.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), representado pelo Chefe de Departamento **Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho** e pelo vice-chefe **Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior**.

Aos **Docentes** que compõe o **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP).

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua coordenadora **Prof^a. Dr^a Ana Claudia Pavarina** e de sua vice-coordenadora **Prof^a. Dr^a Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves**, pela oportunidade de ser aluno deste tão conceituado programa.

Ao **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** e a **Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) da Universidade

Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), por terem aceitado participar da minha banca de pré-qualificação e qualificação sugerindo importantes alterações para o presente trabalho.

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Marchetto** do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), por ter gentilmente ajudado na obtenção das medidas de Fluorescência.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – (FCFAR) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), por todo o apoio concedido para síntese e caracterização das micelas para a realização desta pesquisa.

Ao **Dr. Joao Augusto Oshiro Junior** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – (FCFAR) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), por ter me auxiliado na síntese das micelas e por todos os ensinamentos como profissional e amigo.

À **Dra. Mônica Freitas** (Técnica) do laboratório multiusuário de Microscopia Eletrônica de Transmissão do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), pela paciência, disponibilidade e ajuda na aquisição das imagens.

À **Dra. Paula Aboud Barbugli** (Técnica) do Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), pela atenção, simpatia, disponibilidade e ajuda na aquisição das imagens dos biofilmes no microscópio confocal.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Creusa, Karen e Valéria**, pelo convívio agradável e pela prontidão e simpatia com que sempre me ajudaram. Gostaria de deixar registrado um agradecimento especial para (Mãe) **Creusa** que sempre me aconselhou e me ajudou ao longo desses anos.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier** pelo auxílio prestado durante todo o curso, pela disponibilidade e pela atenção com que sempre atenderam as minhas solicitações.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela preparação da ficha catalográfica, pelas orientações quanto as normas

de preparação deste trabalho e pela ajuda na busca de dissertações, teses, livros artigos e revistas.

Aos **meus amigos de Pós-graduação** pelo convívio diário dos bons e maus momentos, **Amanda Lima, Stephania Rodolfo, Carmelia Lobo, Jessica Katarine, Joatan Costa, Eran Almeida, Taty Manzoli, Bruna Vallerini, Monica Tinajero e Paula Masetti**. Quero agradecer especialmente a **Lucas Portela** por ter sido um grande amigo e por ter ajudado em tudo nos primeiros dias quando cheguei em Araraquara. Também quero agradecer especialmente a **Priscila Borges** por todo o apoio que tive ao decorrer dos experimentos de microbiologia.

Quero também agradecer **aos meus amigos** que considero hoje como irmãs e irmãos, que tive a oportunidade de conhecer nessa jornada de mestrado, **Marcela Dantas e Thaís Soares** obrigado por todo apoio, conselhos e pela amizade no decorrer desses dois anos, espero que nossa amizade cresça mais e mais a cada dia! E no último ano tive a oportunidade de conhecer **João Besegato e Aryvelto Miranda**, vocês chegaram para acrescentar e eu só tenho a agradecer pela amizade, convívio e conselhos diários, e que nossa amizade também só cresça mais e mais!

Aos **meus amigos de Teresina/PI** quero agradecer por todo apoio e incentivo desde quando decidi fazer a prova do mestrado em Araraquara, que mesmo com a distância que nos separa não perdemos a amizade, mostrando a amizade verdadeira que temos, agradeço a **Sâmmea Vieira, Pedro Correia, Fernanda Brito, Artemis Carvalho, Matheus Tajra e André do Vale**.

Aos **meus amigos Felipe Melo e Valdemir Junior** quero agradecer pelo apoio desde quando cheguei no estado de São Paulo e também pelos conselhos e o bom convívio sempre quando vou em São Paulo/SP.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº 2017/17839-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, **minha eterna gratidão!**

Santos DDL. Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127 sobre biofilme de *Streptococcus mutans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

A inativação fotodinâmica é descrita como terapêutica promissora na inativação de micro-organismos bucais. A curcumina é um fotossensibilizador com característica hidrofóbica, e que pode comprometer a sua eficiência. Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de estudos que verifiquem o seu efeito quando conjugada a micelas poliméricas. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da inativação fotodinâmica em biofilme de *Streptococcus mutans* utilizando-se curcumina, conjugada ou não, a micelas como fotossensibilizador, irradiado por luz LED. Realizou-se a caracterização das micelas poliméricas nas concentrações de 0.1 e 0.5% de curcumina, por meio do Potencial Zeta, determinação do espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão e a investigação dos mecanismos envolvidos na reação fotodinâmica. Após, foi selecionada a melhor concentração a ser utilizada na inativação fotodinâmica sobre biofilme de *Streptococcus mutans*. As concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) foram determinadas. Foram induzidos em placa de 96 poços biofilmes *single* espécie. Os biofilmes foram irradiados uniformemente com sistema de iluminação a LED (Biotable, MMO) em comprimento de onda de 460 nm com dose/densidade de energia de 15 J/cm². Unidades formadoras de colônia (UFC/mL), a partir da CIM e CBM foram obtidas. Por meio de microscopia confocal utilizando-se corante BacLight® LIVE/DEAD foi avaliado a viabilidade celular nos biofilmes. Diferentes Grupos foram analisados: FSM+L+ (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic + Luz), FSD+L+ (Fotossensibilizador em DMSO 10% + Luz), M+L+ (Micelas de Pluronic + Luz), D+L+ (DMSO 10% + Luz), FS-L+ (Água Milli-Q + Luz), FSM+L- (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic - Luz), FSD+L- (Fotossensibilizador em DMSO 10% - Luz), M+L- (Micelas de Pluronic - Luz), FS-L- (Água Milli-Q - Luz: Grupo controle negativo) e C+L- (Clorexidina a 0.2%: Grupo controle positivo). Após avaliação dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ANOVA com correção de Welch, para comparação múltipla foi utilizado Pós-hoc de Games-Howell e Pós-hoc de Tukey. Ambos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. Para os grupos tratados com luz e valor de $\alpha < 0,05$, os resultados mostraram que os grupos FSM+L+ (3,41log10) e FSD+L+ (1,92log10) foram semelhantes ($p=0,122$) e diferentes de M+L+, D+L+ e FS-L+ ($p\leq 0,027$). A viabilidade de *Streptococcus mutans* na presença de curcumina conjugada a micelas foi substancialmente reduzida por irradiação com LED. Assim, torna-se factível a utilização de micelas de Pluronic® F-127 como alternativa viável para veiculação da curcumina a ser utilizada na inativação fotodinâmica, sem a necessidade de incorporação prévia da curcumina a solventes como etanol e DMSO.

Palavras-chave: Curcumina. Micelas. Fotoquimioterapia. *Streptococcus mutans*. Biofilmes.

Santos DDL. Photodynamic inactivation using Pluronic® F-127 conjugated curcumin on the biofilm of *Streptococcus mutans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Photodynamic inactivation is described as promising therapy in the inactivation of oral microorganisms. Curcumin is a hydrophobic photosensitizer, which can compromise its efficiency. Thus, the development of studies that verify its effect when conjugated to polymeric micelles becomes relevant. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of photodynamic inactivation in *Streptococcus mutans* biofilm using curcumin, conjugated or not, to micelles as photosensitizer, irradiated by LED light. The characterization of the polymeric micelles in the 0.1% and 0.5% concentrations of curcumin was carried out by Zeta Potential, determination of dynamic light scattering, transmission electron microscopy and investigation of the mechanisms involved in the photodynamic reaction. After that, the best concentration to be used in photodynamic inactivation on *Streptococcus mutans* biofilm was selected. Minimum inhibitory concentrations (MIC), minimal bactericidal (MBC) were determined. Single-species biofilms were induced in 96-well plate. The biofilms were uniformly irradiated with a LED illumination system (Biotable, MMO) at wavelength of 460 nm with dose or energy density of 15 J/cm². Colony forming units (CFU / mL) from CIM and CBM were obtained. By means of confocal microscopy using BacLight® LIVE/DEAD dye, cell viability in biofilms was evaluated. Different groups were analyzed: FSM+L+ (Photosensitizer conjugate micelles Pluronic + Light), FSD+L+ (Photosensitizer in 10% DMSO + Light), M+L+ (Micelles Pluronic + Light), D+L+ (10% DMSO + Light), FS-L+ (Milli-Q Water+ Light), FSM+L- (Photosensitizer conjugated Pluronic micelles - Light), FSD+L- (Photosensitizer in 10% DMSO - Light), M+L- (Micelles Pluronic - Light), FS-L- (Milli-Q Water- Light: Negative control group) and C+L- (Chlorhexidine 0.2%: Positive control group). After evaluating the assumptions of normality and homoscedasticity, the data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and ANOVA with Welch correction, for multiple comparison was used Post-hoc Games-Howell and Post-hoc of Tukey. Both tests were performed at a significance level of 5%. For the groups treated with light and value of $\alpha < 0,05$ the results showed that the groups FSM+L+ (3,41log10) and FSD+L+ (1,92log10) were similar ($p=0,122$) and different from M+L+, D+L+ e FS-L+ ($p\leq 0,027$). The viability of *Streptococcus mutans* in the presence of curcumin conjugated to micelles was substantially reduced by irradiation with LED light. Thus, it becomes feasible to use Pluronic® F-127 micelles as a viable alternative for curcumin to be used for photodynamic inactivation, without the need for prior incorporation of curcumin to solvents such as ethanol and DMSO.

Keywords: Curcumin. Micelles. Photochemotherapy. Biofilms. *Streptococcus mutans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho da reação fotoquímica presente na inativação fotodinâmica, descrevendo a produção de radicais livres após a excitação do fotossensibilizador com luz.....	21
Figura 2 - Rizoma e curcumina em pó (A), <i>Curcuma longa</i> Linn: planta com flor (B).....	24
Figura 3 - Estrutura química.....	25
Figura 4 - Representação da micela com fármaco incorporando.....	29
Figura 5 - Estrutura química do Pluronic® F-127.....	29
Figura 6 - Representação esquemática de uma micela polimérica.....	31
Figura 7 - Representação esquemática da produção de micelas poliméricas pelo método de formação de filme polimérico.....	32
Figura 8 - Evaporador rotatório com uma bomba a vácuo.....	32
Figura 9 - Evaporação total do clorofórmio no fundo do balão indicando formação de filme polimérico.....	32
Figura 10 - (A) Agitador magnético e (B) Dispensador do tipo mecânico (rotor estator) modelo IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic.....	33
Figura 11 - Espectrofotometria de correlação de fótons (Photon Correlation Spectroscopy - PCS; Autosizer Malvern Instruments IV).....	34
Figura 12 - Espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis).....	36
Figura 13 - (A) Centrífuga Ex celsa II (Fanem, Mod. 206 BL) e (B) Espectrofotômetro Visível (Modelo VM-5, Bel Photonics).....	37
Figura 14 - (A) Incubadora com agitação orbital (QUIMIS) e (B) Biotable (MMO).....	38
Figura 15 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de micelas poliméricas de Pluronic® F-127.....	44
Figura 16 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%.....	44
Figura 17 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5%.....	45

Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%.....	46
Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5%.....	46
Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão das micelas de Pluronic® F-127.....	47
Figura 21 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%.....	49
Figura 22 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1% após a irradiação com luz LED.....	49
Figura 23 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5%.....	50
Figura 24 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5% após a irradiação com luz LED.....	50
Figura 25 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.1%.....	51
Figura 26 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.1% após a irradiação com luz LED.....	51
Figura 27 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.5%.....	52
Figura 28 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.5% após a irradiação com luz LED.....	52
Figura 29 – Crescimento bacteriano nas placas de petri na diluição de 270 µM.....	53
Figura 30 – Determinação da concentração inibitória e concentração bactericida mínima.....	53
Figura 31 – Grupos experimentais tratados com luz.....	54
Figura 32 – Grupos experimentais tratados sem luz.....	55
Figura 33 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 20x/0.3 dos biofilmes após inativação fotodinâmica. As letras A, B, C, D e E correspondem aos grupos FSD+L+, FSM+L+, M+L+, FS-L+ e D+L+ respectivamente.....	56
Figura 34 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 63x/0.3 dos biofilmes após inativação fotodinâmica. As letras A, B, C, D e E correspondem aos	

grupos FSD+L+, FSM+L+, M+L+, FS-L+ e D+L+ respectivamente.....56

Figura 35 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 20x/0.3 dos biofilmes para os grupos de citotoxicidade no escuro. As letras A, B, C, D, E, e F correspondem aos grupos FSD+L-, FSM+L-, M+L-, FS-L-, D+L- e C+L- respectivamente.....57

Figura 36 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 63x/0.3 dos biofilmes para os grupos de citotoxicidade no escuro. As letras A, B, C, D, E e F correspondem aos grupos FSD+L-, FSM+L-, M+L-, FS-L-, D+L- e C+L- respectivamente.....57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicas.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 <i>Streptococcus Mutans</i> e a Cárie Dentária.....	18
3.2 Inativação Fotodinâmica.....	19
3.3 Fotossensibilizadores.....	23
3.4 Curcumina.....	24
3.5 Nanotecnologia.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Método de Preparação das Micelas Poliméricas.....	31
4.2 Fotossensibilizador Utilizado	35
4.3 Investigação dos Mecanismos Envolvidos na Reação Fotodinâmica.....	36
4.4 Seleção da Bactéria e Preparo da Suspensão Bacteriana Padronizada.....	36
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida (CBM).....	37
4.6 Formação do Biofilme Bacteriano in vitro em Fundo de Placa de 96 Poços.....	39
4.7 Avaliação da Citotoxicidade no Escuro do Fotossensibilizador	39
4.8 Inativação Fotodinâmica (IFD)	39
4.9 Avaliação Quantitativa das Células Bacterianas dos Biofilmes.....	40
4.10 Análise em Microscópio Confocal a Laser.....	41
4.11 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral possui ampla quantidade de nutrientes e, sem dúvida caracteriza-se como local propício para a formação de biofilmes microbianos. A cavidade oral possui a flora microbiana mais complexa do corpo humano, constituída por mais de 700 espécies bacterianas diferentes, entre essas encontra-se o principal fator etiológico da cárie dentária conhecida como *Streptococcus mutans*. A cárie dentária está entre as doenças humanas mais prevalentes, que progride lentamente e é caracterizada pela destruição localizada e irreversível das estruturas dentais¹⁻⁵.

O *Streptococcus mutans* é uma espécie de bactéria Gram-positiva que se encontra na cavidade oral e, mais especificamente, nos biofilmes multiespécies encontrados na superfície dos dentes². A capacidade de sobreviver num ambiente ácido é devido a modulação das vias metabólicas do açúcar associadas às ligações de adesão aos dentes, sendo isso um componente chave para a patogênese do *Streptococcus mutans*. A capacidade do *Streptococcus mutans* de co-agregar com outras espécies microbianas, seguido por proliferação e disseminação, possibilita o acesso aos tecidos mais profundos, causando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita no esmalte e na dentina, o que resulta em cavitação das estruturas dentais, ou seja, promove a deterioração do elemento dental^{3,6}. Se não for evitada, esta cavitação proporcionará um nicho onde os micro-organismos formarão biofilme, permitindo que a cárie progrida gradualmente. Apesar de todos os avanços científicos na cariologia nos últimos 150 anos¹, os custos associados a ensaios clínicos suficientemente rigorosos e o estado da cárie dentária como uma condição sem risco de vida provavelmente continuarão impedindo o avanço de novas terapêuticas no mercado⁷.

De forma geral, a organização dos micro-organismos em biofilme promove diminuição considerável na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, dificultando a ação das fármacos e aumentando a resistência aos diferentes agentes^{8,9}. A clorexidina é o agente antimicrobiano mais frequentemente utilizado para descontaminação bucal previamente a procedimentos cirúrgicos, e também em descontaminação de sítios infecciosos como lesões cariosas e bolsas periodontais¹⁰⁻¹² além outras diversas aplicações. Entretanto, a clorexidina apresenta alguns efeitos colaterais, tais como: alteração na coloração nos elementos dentários, restaurações, próteses, perda do paladar, queimaduras no tecido mole entre outros¹³. O desenvolvimento de cepas resistentes à clorexidina já vem sendo apontada na

literatura¹⁴. Em vista disso, a busca por outros agentes antimicrobianos e o desenvolvimento de tratamentos alternativos torna-se muito relevante¹⁵.

A inativação fotodinâmica vem sendo apontada como modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos bucais, especialmente visando impedir ou prevenir os problemas relacionados com a resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos existentes no mercado^{16–18}. Essa terapia ocorre da interação entre um fotossensibilizador, um comprimento de onda apropriado e o oxigênio¹⁹. Atualmente existe vários fotossensibilizadores no mercado, como por exemplo a curcumina, que apesar de seu grande potencial como agente fotossensibilizador, possui baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo a alternativa utilizada para a solubilização do pó a sua dissolução em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol previamente à incorporação em água^{18,20–24}. No entanto, a utilização clínica desses solventes não ser desejável devido às características desses solventes, por exemplo o DMSO é totalmente absorvido pela pele ou mucosa, indo diretamente para corrente sanguínea e que em altas concentrações apresenta toxicidade. Dessa forma, para que a inativação fotodinâmica (IFD) mediada pela curcumina possa ser indicada clinicamente no controle de micro-organismos bucais, a investigação de veículos biocompatíveis capazes de solubilizá-la e de manter seu excelente efeito fotodinâmico ainda é necessária¹⁵.

Devido à natureza hidrofóbica de alguns fotossensibilizantes e a rápida absorção deste, o sistema de liberação deve ser capaz de proteger e manter o fotossensibilizador de natureza hidrofóbica sem perda ou alteração da sua atividade, conservando sua forma monomérica e determinando, assim, sua eficácia. Os Pluronicos são copolímeros em bloco, sendo à base de óxidos de etileno e de propileno do tipo $E_mP_nE_m$ (onde E denota o bloco de óxido de etileno, P o bloco de óxido de propileno e os m e n subscritos indicam as unidades repetitivas de E e P). Esses polímeros triblocos favorecem significativamente o efeito anticancerígeno, antimicrobiano e antioxidante²⁵. Além disso, os Pluronicos são caracterizados pela sua estrutura anfifílica (moléculas que possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica) e por isso são capazes de se agregar em solução aquosa^{26,27}. Trabalhos mostram que os Pluronicos solubilizam eficientemente tanto porfirinas hidrofóbicas²⁸ quanto hidrofílicas²⁹, e um estudo recente mostrou que a formação de micelas poliméricas mistas aumenta a estabilidade e a solubilidade da curcumina²⁵.

Para aplicações farmacêuticas é interessante utilizar tensoativos poliméricos não iônicos, como polímeros em bloco do tipo oxi-alquílicos. Tem-se especial interesse nos triblocos da classe dos Pluronic, devido à baixa toxicidade em comparação aos tensoativos convencionais³⁰. Esses copolímeros em bloco com caráter anfifílico formam micelas capazes de se combinar com o fármaco e otimizar a solubilidade, a estabilidade, a permeabilidade, controlar a liberação e proteger o fármaco. Micelas são partículas de tamanho coloidal (10–100 nm) formadas em função da diminuição da energia entrópica do sistema dada a natureza anfifílica do polímero²⁷. As micelas poliméricas favorecem a absorção e incorporação dos fármacos pelos sistemas celulares, com menor toxicidade e efeitos colaterais³⁰.

As micelas de Pluronic possuem grupos oxipropilênicos na parte interna correspondente ao núcleo sendo mais hidrofóbica, e os grupos oxietilênicos nas extremidades mais hidrofílicas, correspondente à corona³¹. Essas micelas são amplamente aplicadas na solubilização de moléculas lipofílicas por meio de interações hidrofóbicas e de van der Waals ao bloco hidrofóbico das micelas. O balanço de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela combinação da quantidade de monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos, resultando na grande versatilidade desses compostos³². A utilização de sistemas micelares de tensoativos poliméricos tem sido constante, usados como sistema de liberação para direcionar o princípio ativo à região alvo, de maneira eficiente e rápida^{33,34}. Estes sistemas apresentam maior solubilização, prevenção da agregação e manutenção das propriedades fotofísicas dos compostos hidrofóbicos.

Dessa forma, sendo a curcumina um fotossensibilizador com característica hidrofóbica e que esta característica pode comprometer a sua eficiência quando utilizada na inativação fotodinâmica sobre biofilmes orais, torna-se extremamente relevante o desenvolvimento de estudos que verifiquem o seu efeito de inativação antimicrobiana quando conjugada a micelas poliméricas como os Pluronic.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da inativação fotodinâmica antimicrobiana, sobre biofilme *single* espécie de *Streptococcus mutans*, utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127 como agente fotossensibilizador, irradiado por fonte de luz LED (diodo emissor de luz).

2.2 Específicas

- Avaliar as características da curcumina conjugada a Pluronic® F-127 e os mecanismos envolvidos na reação fotodinâmica por meio das espectroscopias de absorção óptica e de fluorescência;
- Avaliar as concentrações inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) para a curcumina conjugada ou não a Pluronic® F-127 (utilizando-se diferentes concentrações iniciais);
- Avaliar a citotoxicidade no escuro (*dark cytotoxicity*) da curcumina conjugada ou não a Pluronic® F-127;
- Avaliar o efeito da inativação fotodinâmica antimicrobiana da curcumina conjugada ou não a Pluronic® F-127 sobre biofilme *single* espécie de *Streptococcus mutans* por meio de unidades formadoras de colônias – UFC/;
- Avaliar por meio de microscopia confocal a laser a viabilidade celular da curcumina conjugada ou não a Pluronic® F-127 em biofilme *single* espécies de *Streptococcus*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Streptococcus Mutans* e a Cárie Dentária

O *Streptococcus mutans* é uma bactéria Gram-positiva que pertence a classe Streptococcus³⁵, é considerada uma espécie de bactéria menos complexas quando comparada com as bactérias Gram-negativas, devido às características presentes em sua parede celular³⁵.

O *Streptococcus mutans* é um micro-organismo bucal acidogênico e acidúrico que produz polissacarídeos e também possui alta capacidade de adesão às superfícies dos dentes, proporcionando a formação de biofilmes orais³⁶. Além disso, esse micro-organismo também é conhecido por causar endocardite infecciosa³⁷. O *Streptococcus mutans* é um dos principais micro-organismos residentes dominantes do biofilme bucal e possui alta capacidade de rápida decomposição de carboidratos da dieta, portanto, considerado a principal bactéria patogênica no desenvolvimento da cárie dentária^{35,38-45}.

A cárie dentária é uma doença com etiologia multifatorial, e é uma das doenças que afeta 36% das pessoas no mundo. O nível avançado da cárie pode danificar significativamente o esmalte e a dentina e, finalmente, resultar em infecção da polpa dentária, podendo acarretar na perda do elemento dental⁴⁶. A cárie dentária pode ser controlada pelos métodos mecânicos e químicos com finalidade de remover o biofilme da superfície dos dentes^{46,47}. Entretanto, essas abordagens apresentam algumas limitações, como por exemplo o dano da mucosa bucal e à resistência antimicrobiana⁴⁸.

Já é bem estabelecido que a cárie dentária é uma doença dependente de biofilme, que é comunidade altamente estruturada de células microbianas ligadas a uma superfície e incorporadas em uma rica matriz polimérica, sendo o *Streptococcus mutans* uma das espécies bacterianas mais frequentes encontradas no biofilme⁴⁹. A principal característica do biofilme formado é a capacidade de não se desagregar facilmente, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que os micro-organismos livres (culturas planctônicas). A matriz polissacarídica produzida pelo biofilme é o principal fator que dificulta a difusão e o acesso de agentes antimicrobianos. Além disso, os exopolissacarídeos insolúveis (IEPS) favorecem a formação de placa dentária, estabilidade do biofilme e integridade estrutural, e estão associados à prevalência de cárie⁵⁰⁻⁵³. Já os polissacarídeos intracelulares (IPS) têm

sido considerados como uma fonte interna de carboidratos para fermentação, contribuindo para o surgimento da cárie dentária^{50,51}.

A capacidade do *Streptococcus mutans* de co-agregar com outras espécies microbianas possivelmente fornece condições que suportam o crescimento de fungos, como por exemplo leveduras, de *Candida albicans*^{6,54,55}. A *Candida albicans* e o *Streptococcus mutans* são habitantes encontrados na cavidade oral humana, e já se sabe que fungos e bactérias sobrevivem juntos em diferentes comunidades, particularmente na forma de biofilme, onde interagem sob vários mecanismos. A associação de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* está envolvida diretamente no aumento da virulência do biofilme⁵⁶, a presença de *Candida albicans* aumenta a produção de exopolissacarídeos (EPS) de tal forma que os biofilmes *duo* espécies acumulam mais biomassa e abrigam mais células viáveis que biofilmes *single* espécies de *Streptococcus mutans*⁵⁰. Além disso, as características bioquímicas e fatores do hospedeiro também fornecem ambiente favorável para a associação desses micro-organismos.

A capacidade de crescer sob condições ácidas, juntamente com a modulação das vias metabólicas do açúcar, são fatores críticos para patogenicidade do *Streptococcus mutans* de aderir e agregar junto com outras bactérias ou fungos, sobre a superfície dentária^{56,57}.

3.2 Inativação Fotodinâmica

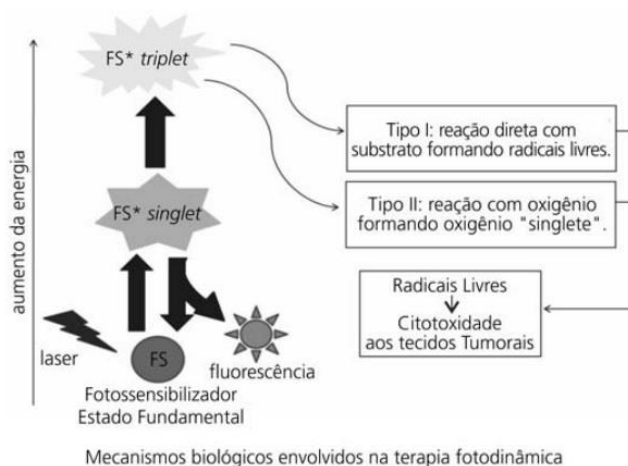
As civilizações antigas já sabiam que poderiam combinar diferentes plantas com a luz do sol para fazer o tratamento de várias doenças na pele. As primeiras experiências com o tratamento fotodinâmico datam aproximadamente de 1900, e foram relatadas por Oscar Raab e Herman von Tappeiner, os quais observaram que a exposição ao corante alaranjado de acridina associado à luz poderia ser letal para protozoários como o paramécio do gênero *Paramecium sp.*, causador da malária⁵⁸. Nem a luz e nem o corante isoladamente tiveram qualquer efeito sobre os paramécios, mas associados foram altamente citotóxicos⁵⁸. A primeira aplicação na Medicina é atribuída a Tappeiner & Jesionek, em 1903, que utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para tratamento de câncer cutâneo. Junto com Jodlbauer, von Tappeiner demonstrou a necessidade de oxigênio nas reações de fotossensibilização e em 1907 eles introduziram o termo "ação fotodinâmica" ao descrever esse fenômeno⁵⁸.

Entretanto, o marco do início da inativação fotodinâmica como tratamento clínico se deu no início dos anos 60. Lipson & Schwartz realizaram o tratamento em uma paciente portadora de câncer de mama, utilizando o derivado de hematoporfirina e irradiação seletiva, logo após resultados promissores de estudos feitos com ratos em tumores transplantados^{59,60}.

A inativação fotodinâmica vem do termo em inglês *photodynamic therapy* (PDT), essa inativação é baseada no acúmulo de um agente fotossensibilizador em um tecido alvo juntamente com a luz no comprimento de onda específico para excitar o fotossensibilizador na presença de oxigênio. Essa combinação causa a excitação do fotossensibilizador que transfere energia (elétrons) para o oxigênio em estado molecular presente no meio que forma oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), ambos responsáveis pelos danos causados nas células-alvo⁶¹. O fotossensibilizador ideal para inativação fotodinâmica deve apresentar algumas características, entre elas à ausência de toxicidade no escuro; não ser cancerígeno ou mutagênico; ser ativado em comprimento de onda específico; não causar dor durante o tratamento; não apresentar efeitos secundários e não causar efeitos deletérios sobre o tecido saudável⁶².

Atualmente existem dois tipos de mecanismos de ação para inativação fotodinâmica no qual ambos podem levar à morte celular ou a destruição do tecido doente, são as reações do tipo I e do tipo II (Fig. 1)^{63,64}. Na reação tipo I ocorre a transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no seu estado tripleto excitado e os componentes do sistema como substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas, gerando assim, íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados (radicais livres reativos ou íons radicais)^{64,65}.

Figura 1 - Desenho da reação fotoquímica presente na inativação fotodinâmica, descrevendo a produção de radicais livres após a excitação do fotossensibilizador com luz



Fonte: Longo et al.⁶⁶.

A grande parte destes radicais reage de forma instantânea com o oxigênio, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila ($-OH$)^{65,67}. As reações decorrentes do tipo I incluem remoção de hidrogênio de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios presentes na membrana, isto afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade aos íons⁶⁷.

Já na reação tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio, gerando oxigênio singleto ($^1O_2$), um agente altamente citotóxico⁶⁷. O $^1O_2$ gerado pode reagir com lipídeos insaturados e proteínas que são os principais constituintes das membranas biológicas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Além disso as reações fotooxidativas provocam alterações da permeabilidade celular, levando a morte da célula-alvo via necrose ou apoptose^{65,67}. As reações do tipo II têm o efeito citotóxico do oxigênio singleto que é um agente oxidante não específico. Este possui reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas, provocando oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios⁶⁸. As células acabam morrendo por não possuírem um mecanismo de defesa contra esta molécula⁶⁹.

Por várias décadas não foi realizado um volume maior de pesquisas na inativação fotodinâmica como tratamento contra doenças causadas por micro-organismos por causa do surgimento dos antibióticos⁷⁰. Como resultado, a descoberta

de novos antimicrobianos tem sido difícil⁷¹ e hoje existe uma grande quantidade de pacientes com infecções para as quais não existem tratamentos eficazes, ou o tratamento possui um alto custo, restringindo assim os tratamento aos pacientes^{72,73}.

A inativação fotodinâmica (IFD) tem sido usada como tratamento alternativo na área odontológica, principalmente para a eliminação de patógenos de infecções microbianas localizadas, como por exemplo, cáries⁷⁴⁻⁷⁷. A IFD possibilita a diminuição do uso de antimicrobianos para esses tipos de infecções, como por exemplo a utilização de antibióticos e antifúngicos para infecções generalizadas, além de diminuir o aparecimento de novos micro-organismos resistentes^{70,78-80}.

A inativação fotodinâmica exhibe grandes vantagens em relação aos antimicrobianos, entre elas: largo espectro de ação, devido ao fotossensibilizador poder agir sobre mais de um grupo de micro-organismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários; eficácia independente de cepas microbianas resistentes a antibióticos; desenvolvimento de protocolos que apresentem redução dos micro-organismos com dano mínimo ao tecido hospedeiro; a não seleção de cepas fotoresistentes após inúmeros tratamentos; disponibilidade de reproduzir formulações que permitam uma entrega específica e liberação controlada do fotossensibilizador na área infectada e uso de uma fonte de luz de baixo custo^{70,81}.

Entretanto, para que a inativação fotodinâmica seja eficaz é necessário um tipo e uma concentração de fotossensibilizador adequada, que é dependente das características físico-químicas da interação feita com a célula ou tecido alvo⁸². Além disso existem outras características importantes do fotossensibilizador que influenciam a eficácia da inativação fotodinâmica como a solubilidade em água e lipídios, estabilidade em meio líquido, constante de ionização e outros fatores específicos como as características de absorção de luz e a eficiência da formação do estado tripleto ou produção de oxigênio singleto^{83,84}.

A inativação fotodinâmica vem sendo considerada uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos bucais, especialmente visando impedir ou prevenir a resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos existentes no mercado^{16-18,85,86}.

3.3 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são moléculas capazes de interagir com a luz na presença de oxigênio. A interação entre fotossensibilizador e luz gera espécies reativas de oxigênio singleto (EROs), que causa dano oxidativo às células^{35,70,87,88}. Os fotossensibilizadores são considerados os principais veículos da inativação fotodinâmica e, quando irradiados no seu comprimento de onda de absorção, são excitados e conseguem fazer a transferência de energia e/ou de elétrons para gerar produtos reativos que resultam em citotoxicidade^{35,70,88}.

Os fotossensibilizadores apresentam diferentes estruturas moleculares e distintas propriedades biofísicas, sendo um grande desafio encontrar um que tenha a habilidade de ser armazenado preferencialmente no interior dos micro-organismos, de forma específica, aumentando o poder de destruição⁸⁹. Uma das características ideais é que o fotossensibilizador não sofra decomposição rápida causada pela luz, para que não haja destruição do mesmo antes de causar o dano fotodinâmico nas células-alvo^{90–96}.

Existem muitas substâncias que possuem o potencial de serem fotossensíveis, porém poucas são utilizadas para tratamento fotodinâmico⁹⁷. A maioria dos fotossensibilizadores são derivados de um núcleo aromático tetrapirrólico encontrado em vários pigmentos naturais, são classificados baseando-se em suas estruturas químicas, podendo pertencer a várias famílias, como por exemplo, a família das porfirinas, clorofilas, ftalocianinas, entre outras⁷⁸.

A concentração do fotossensibilizador é um fator de relevância para o sucesso da reação fotodinâmica que deve ser minimamente tóxica e não deve produzir danos ao tecido-alvo antes da ativação pela fonte de luz²⁴. O tempo de pré-irradiação também possui grande relevância, pois neste intervalo entre a administração e irradiação, espera-se que o fotossensibilizador esteja presente no interior das células-alvo²³.

A formação de agregados e a rápida fotodegradação do fotossensibilizador são dois fatores que prejudicam o processo da inativação fotodinâmica. A fotodegradação é a modificação da estrutura do composto, causada pelas espécies reativas tóxicas (principalmente o oxigênio singleto) produzidas durante a inativação fotodinâmica pelo próprio fotossensibilizador. Esta modificação reduz a quantidade de fotossensibilizador, provocando queda da ação fotodinâmica e provocando assim a

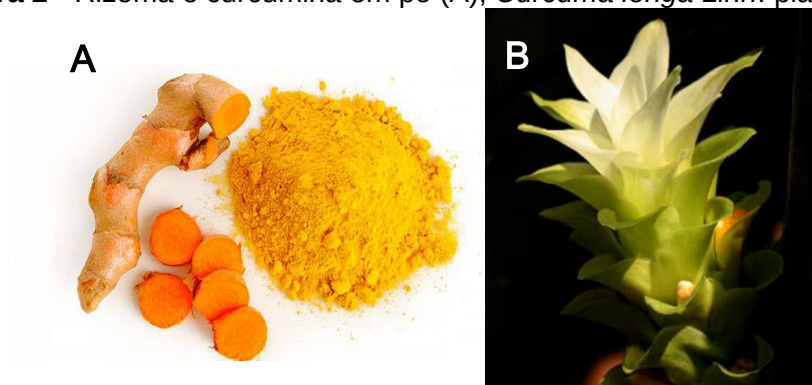
perda na eficiência do processo, dificultando a destruição completa dos micro-organismos⁹⁸.

Já a formação de agregados entre as moléculas do fotossensibilizador prejudica a geração de espécies reativas de oxigênio, pois quando o fotossensibilizador encontra-se na forma agregada, é menos ativo, dificultando o processo de transferência de energia para geração de oxigênio singleto. Estes agregados são formados à medida que a concentração de fotossensibilizador é aumentada numa solução ou quando um fotossensibilizador que possui caráter hidrofóbico estiver presente em meio aquoso, por causa da falta de afinidade com a água⁶².

3.4 Curcumina

A curcumina (pigmento amarelo) é o ingrediente ativo de especiarias e é extraída da cúrcuma (*Curcuma longa* Linn) também conhecida como açafrão-da-terra⁹⁹, turmerico, raiz-de-sol, açafrão-da-índia, açafroa e gengibre amarelo. Pertence à família *Zingiberaceae* e é uma planta perene de haste curta com cerca de 100 cm de altura, que possui flores brancas e rizomas cilíndricos (Fig. 2)¹⁰⁰. É uma planta amplamente cultivada em clima tropical e subtropical podendo ser encontrada na Índia, na China e no sudeste da Ásia, sendo a Índia o maior produtor de cúrcuma¹⁰¹.

Figura 2 - Rizoma e curcumina em pó (A), *Curcuma longa* Linn: planta com flor (B)



Fonte: Google Imagens, Imagem adaptada, 2019.

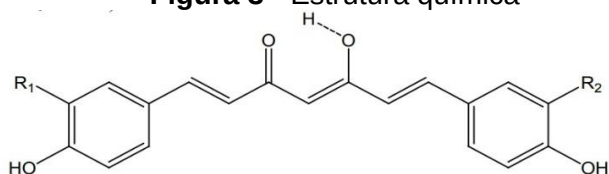
A raiz é a parte usada como especiaria, que é limpa, seca e moída, sendo utilizada como corante alimentício natural em laticínios, bebidas, mostarda e macarrões, entre outros¹⁰¹. Além de ser comum na culinária indiana e asiática é muito usada na medicina alternativa, fazendo parte de receitas de cosméticos como máscaras faciais e pomadas para pele oleosa^{102,103}. A cúrcuma também é utilizada

como corante natural para o tingimento de tecidos. Na Índia, por exemplo, ela foi muito usada para tingir de amarelo os mantos de monges budistas^{100,102,103}.

A curcumina tem característica de ser uma molécula hidrofóbica^{104,105} que requer um veículo para permitir que seja usada na inativação fotodinâmica^{106–108}. Ela é ativada pela luz azul e tem um pico de absorção bastante amplo (faixa de 300 a 500 nm) com uma banda de absorção máxima no comprimento de onda de 430 nm¹⁰⁹. Atualmente a curcumina é bastante usada na odontologia para erradicar os patógenos orais^{11,18,20,40,107,110–124}.

A curcumina é um polifenol denominado [(*E,E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], de fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$, massa molar de 368,38 g mol⁻¹ e com ponto de fusão a 183°C¹⁰⁶. A estrutura química a torna praticamente insolúvel em água em pH ácido e neutro, mas solúvel em metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona¹⁰⁶. Os curcuminóides: curcumina, desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina são os principais extraídos da *Curcuma Longa Linn* (Fig. 3), os quais constituem aproximadamente 3 a 5% da maioria das preparações de cúrcuma e fornece a coloração amarela ao pó¹⁰⁰. A curcumina disponível comercialmente é composta pela mistura desses três curcuminóides, sendo a proporção de 75-80% de curcumina, 15-20% de desmetoxicurcumina e 3-5% de bisdesmetoxicurcumina¹²⁵.

Figura 3 - Estrutura química



Curcumin: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$

Demethoxycurcumin: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$

Bisdesmethoxycurcumin: $R_1 = H$, $R_2 = H$

Fonte: Rohman¹⁰¹.

Os curcuminóides têm sido extensivamente estudados devido à sua ampla variedade de propriedades farmacológicas. As propriedades farmacológicas têm sido relatadas em vários estudos tendo efeitos antioxidantes e antiinflamatórios^{126,127}, antibacterianos¹²⁸, antifúngicos¹²⁹ e anticarcinogênicos^{126,130}, principalmente com altas doses quando isolada. A curcumina isolada pode ser menos efetiva do que a mistura dos três curcuminóides uma vez que cada composto apresenta

individualmente uma determinada atividade farmacológica. A mistura dos três curcuminóides complementa a ação um do outro e permite uma atuação por diversas vias. Por esse motivo, a curcumina comercial oferece melhor potencial terapêutico quando comparada com a isolada¹²⁵.

Estudos mostraram que a curcumina apresentou atividade farmacológica contra várias doenças como diabetes tipo II, artrite reumatoide, fibrose cística, esclerose múltipla e aterosclerose^{131,132}. Estudo recente aponta efeito no combate da doença de Alzheimer¹²⁵. Além disso ela também inibe a agregação plaquetária, protege contra formação da catarata e melhora a cicatrização de feridas¹³¹. Ela tem sido extensivamente estudada na atividade antitumoral, e sendo então usada para prevenção e tratamento de uma grande variedade de cânceres incluindo gastrointestinal, cólon, pancreático, fígado, melanoma, genito-urinário, próstata, mama, linfoma, ovário, pulmão, leucemia, cabeça e pescoço, neurológico e sarcoma^{131,132}.

A população na Índia consome em média 2,5 g de cúrcuma por dia, que corresponde a aproximadamente 100 mg de curcumina; mesmo com esse consumo diário, estudos não relataram possível toxicidade ou efeitos adversos¹⁰⁰. A curcumina também possui um perfil de segurança ótimo para a administração oral de altas doses, existindo uma tolerância de doses de 12 g por dia em humanos¹³¹. Por conta de seu perfil de toxicidade e segurança, e baseado em vários ensaios clínicos, a dose recomendada para a administração de curcumina deve ser entre 4 e 8 g, sendo possível assim obter o máximo dos efeitos terapêuticos¹⁰⁰.

Os fotossensibilizantes por possuírem natureza hidrofóbica e a rápida absorção necessitam de um transportador capaz de protegê-los sem que ocorra a alteração da sua atividade, e assim conservar sua eficácia^{133,134}. Pesquisas têm sido realizadas a fim de encontrar a melhor forma para a veicular a curcumina com estabilidade e solubilidade aceitáveis. Entretanto, o desenvolvimento de formulações têm esbarrado em dificuldades devido sua baixa solubilidade em água e seu tempo de vida curto, resultando em baixa biodisponibilidade¹³³.

3.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia é definida como a ciência que envolve o planejamento, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos que possuem dimensões na escala manométrica [O prefixo "nano" vem do grego e significa "anão", 1 nanometro (nm) equivale à bilionésima parte de um metro (10E-9m)].

O objetivo é elaborar estruturas estáveis e melhores do que se estivessem em sua forma "normal". Isso porque os elementos se comportam de maneira diferente em nanoescala¹³⁵. Atualmente a nanotecnologia está presente na agricultura, eletrônica, fibras e têxteis, ciências forenses, no espaço e na terapêutica médica¹³⁶. Na área farmacêutica também tem se realizado estudos no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica com o intuito de direcionar e controlar a liberação de fármacos¹³⁷.

O físico americano Richard Feynman introduziu os primeiros conceitos de nanotecnologia em sua famosa palestra "There's plenty of room at the bottom", no ano de 1959¹³⁸. Entretanto, apenas em 1974 por Norio Taniguchi o termo "nanotecnologia" foi criado e usado para descrever a habilidade de se criar materiais na escala manométrica¹³⁹. Hoje os pesquisadores estão conseguindo entender e manipular materiais na escala de átomos e moléculas para aplicar em diversos campos da ciência¹³⁸. Pesquisas de novos nanomateriais podem trazer avanços em diferentes áreas, um dos campos que tem o potencial de revolucionar é a saúde, especificamente na produção de fármacos^{140,141}. A nanotecnologia pode trazer avanços tecnológicos não somente no desenvolvimento de novos fármacos, mas também na reformulação daqueles já existentes, visando melhorar sua eficácia, direcionamento e diminuir os efeitos colaterais^{140,141}.

O uso da nanotecnologia é extremamente importante na inativação fotodinâmica, entretanto as características dos fotossensibilizadores como rápida eliminação pelo organismo, baixa taxa de acumulação nos tecidos de interesse, baixa solubilidade e rápida degradação limitam a sua aplicação. Um exemplo é a agregação das moléculas do fotossensibilizador em meio aquoso que afeta fotoativação (diminuição da formação $^1\text{O}_2$) por serem moléculas hidrofóbicas^{142,143}. Uma alternativa para solucionar essas características dos fotossensibilizadores é o uso da nanotecnologia, pois as nanopartículas podem ser utilizadas como sistema de liberação, melhorando-se dispersão em sistemas aquosos¹⁴²⁻¹⁴⁴.

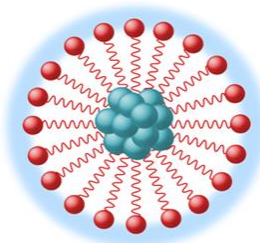
O sistema de liberação ideal deve ser capaz de incorporar o fotossensibilizador sem que ele perca ou altere sua atividade na aplicação da inativação fotodinâmica. Os sistemas de liberação podem ser micelas, lipossomos, nanopartículas poliméricas, nanocristais, nanotubos, nanopartículas metálicas e nanopartículas cerâmicas^{145,146}. As características dos sistemas de liberação empregados irão determinar a farmacocinética, o comportamento e a interação do fotossensibilizador¹⁴⁷.

As vantagens da nanotecnologia para um fármaco são: proteção do princípio ativo, promover concentrações constantes; proteção contra a degradação precoce; aumento da eficácia terapêutica; liberação controlada e progressiva, condicionada aos estímulos do meio; diminuição da toxicidade; melhora da estabilidade; possibilidade de incorporação; diminuição da dose terapêutica e diminuição do número de administrações^{148,149}.

O termo nanopartícula pode englobar tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas, as quais se diferem pela sua composição e estrutura. Entre esses sistemas nanoestruturados, estão as micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, lipossomos, nanopartículas magnéticas, nanopartículas metálicas e as nanopartículas baseadas em ácidos nucleicos^{150,151}.

Os nanossistemas de liberação podem ser considerados como uma tecnologia prática no melhoramento da solubilidade e biodisponibilidade de fármacos insolúveis¹⁵². Como exemplos de sistemas de liberação têm-se as micelas que são nanopartículas podendo ter tamanho entre 10 e 100 nm. Micelas são compostas por blocos anfífilos de copolímeros ou lipídeos com uma estrutura *core-shell*, formadas em função da diminuição da energia entrópica do sistema^{131,153}.

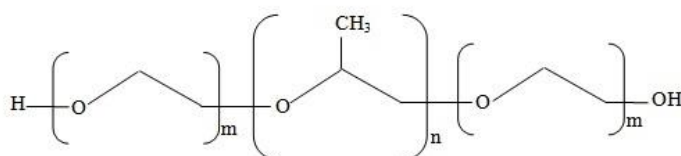
As micelas poliméricas têm a característica de incorporar altas quantidades de fármacos hidrofóbicos em seu núcleo, assim diversos fármacos podem ser solubilizados em micelas poliméricas^{154,155}. Do ponto de vista prático, micelas poliméricas são fáceis de preparar e esterilizar¹⁵⁶. Em ambientes aquosos, blocos hidrofílicos formam a região mais externa das micelas e os blocos hidrofóbicos formam o centro da micela no qual fármacos hidrofóbicos podem ser incorporados¹⁵⁷, que para a inativação fotodinâmica esse sistema se torna ideal para incorporação de fotossensibilizadores (Fig. 4).

Figura 4 - Representação da micela com fármaco incorporando

Fonte: Brito et al.²⁷.

O balanço de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela combinação da quantidade de monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos, resultando na grande versatilidade desses compostos³². Sejam essas constituídas de tensoativos clássicos ou de copolímeros, o balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio¹⁵⁸. A força repulsiva contrária é resultado das interações estéricas e/ou eletrostáticas associadas aos grupamentos hidrofílicos em relação aos grupamentos hidrofóbicos como força atrativa. O processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas¹⁵⁹.

Os copolímeros do tipo Pluronic foram introduzidos na década de 50 intitulados de poloxâmeros, consistem de arranjos de blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) e blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (PPO) organizados em uma estrutura tribloco A-B-A: PEO-PPO-PEO (Fig. 5). Esses polímeros tribloco favorecerem o transporte de fármacos e são capazes de se agregar em solução aquosa^{26,27}.

Figura 5 - Estrutura química do Pluronic® F-127

Fonte: Brito et al.²⁷.

Os copolímeros pluronics comumente utilizados incluem F68, F87, P105, P123, L121, L61 e F127. Nos últimos anos os pluronics estão sendo de grande interesse para a produção de sistemas carreadores de fármacos devido às vantagens que eles oferecem como tamanho pequeno das micelas e baixa concentração micelar

critica. Pluronic são biocompatíveis, não tóxicos e são capazes de interagir com membranas biológicas e superfícies hidrofóbicas¹⁶⁰. Em adição, eles podem inibir a bomba de efluxo glicoproteína-P (P-gp), aumentando a absorção de determinados fármacos¹⁶¹.

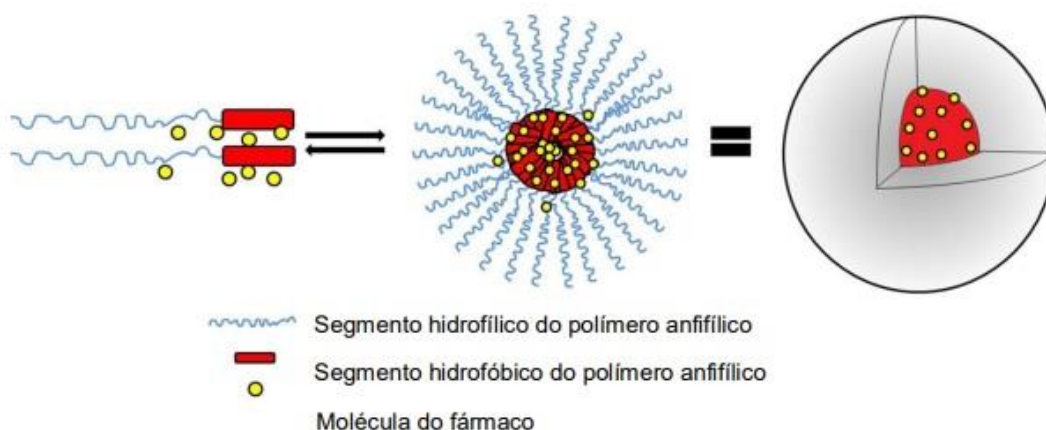
Sendo assim, as nanopartículas poliméricas apresentam um grande potencial como agente sistema de liberação de fotossensibilizadores, pois sua superfície pode ser modificada quimicamente, possibilitando a incorporação, além de serem biodegradáveis, não tóxicas e sem atividade, possibilitando a construção de um dispositivo multifuncional¹⁶².

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Método de Preparação das Micelas Poliméricas

Utilizou-se o copolímero Pluronic® F-127, produzido pela BASF Corp. e fornecido pela Sigma Aldrich (Lote: SLBS1853V) para obtenção das micelas conjugadas a curcumina (Fig. 6).

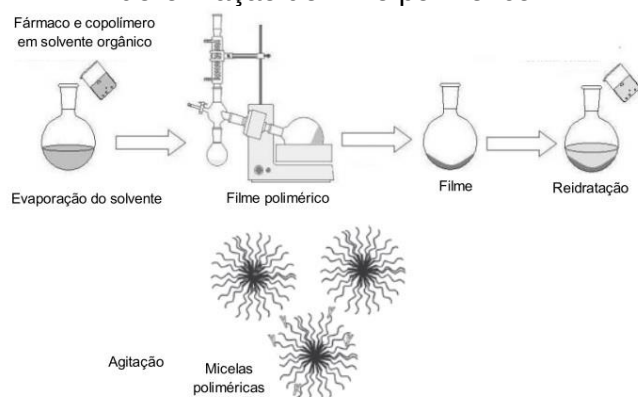
Figura 6 - Representação esquemática de uma micela polimérica



Fonte: Oses¹⁶³.

A metodologia utilizada foi baseada na técnica de evaporação de solvente ou “filme polimérico”¹⁶³ (Fig. 7). Os sistemas foram preparados em 3 balões de diluição de fundo redondo de 50 mL com diferentes concentrações de curcumina (0%; 0,1% e 0,5% sendo 0 mg, 0,6 mg e 3 mg respectivamente) para cada 600 mg de Pluronic® F-127. Cada concentração foi previamente dissolvida em 25 mL do solvente clorofórmio (Merck, Brasil) (Lote:843745-88). Realizou-se a agitação manual durante cerca de 2 minutos para assegurar uma homogeneização/dissolução de cada solução. As nanopartículas foram produzidas utilizando-se um evaporador rotatório Model: RV 10D (Série:07324380) com uma bomba de vácuo (MARCONI) (Lote: 350847) a 78 kPa, agitação de 55 r.p.m., água do banho (50°C) e uma coluna de refrigeração a cerca de 8°C (Fig. 8). O balão de diluição foi corretamente encaixado no agitador e imerso na água do banho, durante cerca de 30 minutos. Após evaporação total do clorofórmio, o fundo do balão torna-se baço (turvo), indicando precipitação e solidificação de um filme polimérico¹⁶³ (Fig. 9).

Figura 7 - Representação esquemática da produção de micelas poliméricas pelo método de formação de filme polimérico



Fonte: Oses¹⁶³.

Figura 8 - Evaporador rotatório com uma bomba a vácuo



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 9 - Evaporação total do clorofórmio no fundo do balão indicando formação de filme polimérico



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Este filme foi posteriormente reidratado (para obter a solução micelar), com as diferentes concentrações, de modo a determinar a influência das concentrações sobre o tamanho e o Potencial Zeta das nanopartículas formadas. Aos respectivos balões de diluição adicionaram-se 30 mL de água ultrapura (Milli-Q) a 30°C, submetendo-se ao um agitador magnético IKA Model: C-MAG HS 7 S3 (Série:07350934) com 700 r.p.m. (Fig. 10), por um período de 30 minutos para promover a formação das micelas. Em seguida as diferentes concentrações foram submetidas a um dispensador do tipo mecânico (rotor estator) modelo IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic (Série:03364795) (Fig. 10), para o preparo das micelas durante 2 minutos na velocidade 4 de rotação do dispersor (15.500 r.p.m.)¹⁶⁴.

Figura 10 - (A) Agitador magnético e (B) Dispensador do tipo mecânico (rotor estator) modelo IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para o presente estudo foi realizada a caracterização das micelas poliméricas durante 3 meses em diferentes concentrações, para mostrar a estabilidade das formulações. Em seguida foi selecionada a melhor concentração a ser utilizada na inativação fotodinâmica sobre biofilme de *Streptococcus mutans*, a partir dos resultados obtidos. A caracterização foi realizada por meio do Potencial Zeta, determinação do espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão e a investigação dos mecanismos envolvidos na reação fotodinâmica.

a) Determinação do Diâmetro Médio e do Potencial Zeta

O diâmetro médio de nanopartículas é importante na avaliação da sua estabilidade, quer para determinar o seu comportamento ou adaptabilidade à via de administração utilizada. As características físico-químicas das várias formulações, com e sem fotossensibilizador conjugado, foram determinadas e comparadas entre si. De modo a efetuar uma caracterização total das partículas [determinação de diâmetro médio (Dm) ou diâmetro hidrodinâmico das micelas (Dh) e do índice de polidispersão (PDI)], utilizando espectrofotometria de correlação de fótons [Photon Correlation Spectroscopy - PCS; Autosizer Malvern Instruments IV (Reino Unido)] (Fig. 11) à temperatura de 25°C, no qual foi diluído as partículas em água desionizada (1:20)^{130,165}.

Figura 11 - Espectrofotometria de correlação de fótons (Photon Correlation Spectroscopy - PCS; Autosizer Malvern Instruments IV)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Esta técnica baseia-se na incidência de um laser de Hélio-Néon ($\lambda = 633$ nm), tendo uma polarização e ângulo de dispersão previamente estipulados (173°), sobre a amostra a estudar. Posteriormente, foi feita a detecção da intensidade de luz dispersa causada pelo movimento das partículas¹⁶⁶. Esta técnica, contrariamente à difração laser, é uma boa ferramenta para avaliar nanopartículas, mas não partículas de maior tamanho, tendo um limite de detecção até cerca de $3 \mu\text{m}$ ¹⁶⁷. A carga de superfície, traduzida pelo Potencial Zeta, é um parâmetro que reflete a carga da partícula, que neste caso terá a contribuição da matriz, do agente tensoactivo (usado na estabilização do sistema coloidal) e da sua interação com o meio envolvente. Sendo assim a concentração de curcumina considerada adequada para incorporação nas micelas foi a máxima concentração em que ainda foram

preservadas as características das micelas (diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão)^{163,168–170}.

b) Microscopia Eletrônica de Transmissão

As soluções com curcumina conjugada ou não ao Pluronic® F-127 foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando o microscópio Philips modelo CM 200 Super Twin operando em uma potência de feixe de 120 kV, pertencente ao laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara – SP, Brasil. As amostras foram preparadas e uma gota de cada amostra foi depositada sobre uma grade de microscopia de cobre, revestida com filme de carbono.

4.2 Fotossensibilizador Utilizado

Para o presente estudo foi utilizada a curcumina (Sigma Aldrich, St Louis, MI, EUA) (Lote: SLBR4883) como fotossensibilizador. Para o preparo utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St Louis, MI, EUA) foi utilizado como solvente para obter solução mãe ou estoque deste fotossensibilizador a 20mM. Esta solução (fotossensibilizador + DMSO) foi diluída em água ultrapura (Milli-Q) para se obter as diferentes concentrações utilizadas no estudo (270 µM a 0.5273 µM) mantendo-se 10% de DMSO na concentração final. Utilizou-se também o Pluronic® F-127 para obter solução mãe ou estoque deste fotossensibilizador a 270 µM apresentado no item 4.1.

As soluções nas diferentes concentrações foram preparadas poucos tempo antes do início dos experimentos evitando-se assim a degradação prematura. Vale ressaltar que a concentração final do fotossensibilizador conjugado ou não foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida (CBM) quando utiliza-se as concentrações iniciais de 270; 135; 67.5; 33.75; 16.875; 8.4375; 4.2187; 2.1093; 1.0546 e 0.5273 µM.

4.3 Investigação dos Mecanismos Envolvidos na Reação Fotodinâmica

a) Medidas de Absorção Óptica

Os espectros de absorção óptica das soluções contendo o fotossensibilizador curcumina conjugada ou não a Pluronic® F-127 foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis) (Fig. 12) empregando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. As soluções contendo o fotossensibilizador foram preparadas no momento do início das medidas com o objetivo de evitar a possível degradação das mesmas. Três mililitros (3 mL) de cada solução foram analisados na região de 300 a 800 nm, com resolução de 1 nm antes e após a irradiação com luz LED no comprimento de onda azul (450 nm).

Figura 12 - Espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis)



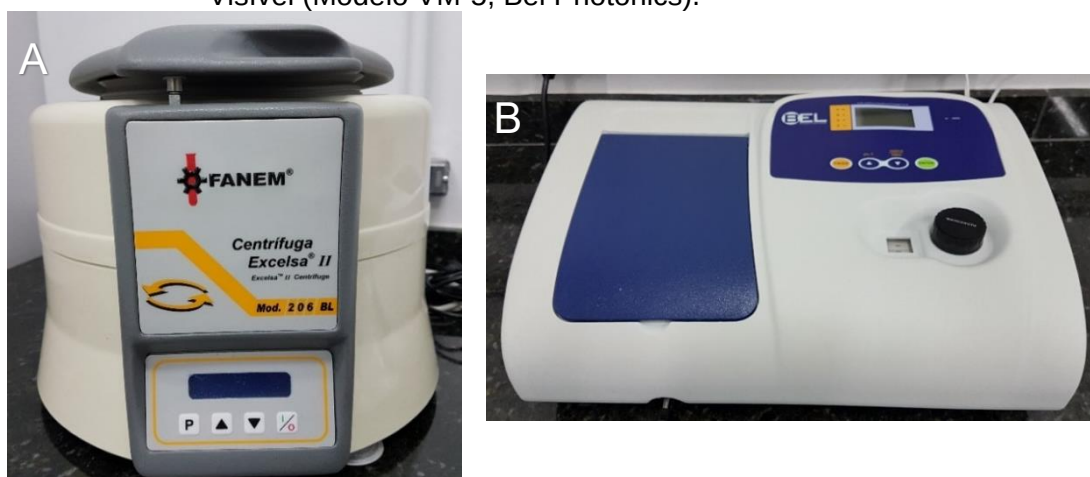
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4 Seleção da Bactéria e Preparo da Suspensão Bacteriana Padronizada

Utilizou-se a cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fornecida pela Fundação FioCruz (Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência, Setor de Bactérias de Referência localizados na Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após reativar e realizar cultura inicial, em tubo Falcon contendo 5 mL de Bacto™ BHI caldo + sacarose a 1% (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA) (Lote:3141047) 3 a 5 colônias foram inoculadas e incubadas por 18 horas a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para ser usado nos experimentos para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), e de indução do biofilme; sendo dessa forma preparada a suspensão bacteriana com absorbância padronizada.

Após o crescimento, a cultura dos tubos com BHI caldo + sacarose a 1% foi transferida para tubo Falcon de 15 mL e centrifugada a 1008 g (3000 r.p.m.) por 15 minutos (Centrífuga Excelsa II, Fanem, Mod. 206 BL) (Série RAM047321) (Fig. 13), proporcionando a obtenção de precipitado da biomassa. O sobrenadante foi descartado e a biomassa resuspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada) até atingir a absorbância padronizada de 0.08-0.1 lida no espectrofotômetro Visível (Modelo VM-5, Bel Photonics) (Série: HC1509041) (Fig. 13) em 600 nm, turvação aproximada a 0.5 da escala de Mc Farland com quantidade de células da ordem de 10^8 células bacterianas/mL.

Figura 13 - (A) Centrífuga Excelsa II (Fanem, Mod. 206 BL) e (B) Espectrofotômetro Visível (Modelo VM-5, Bel Photonics).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

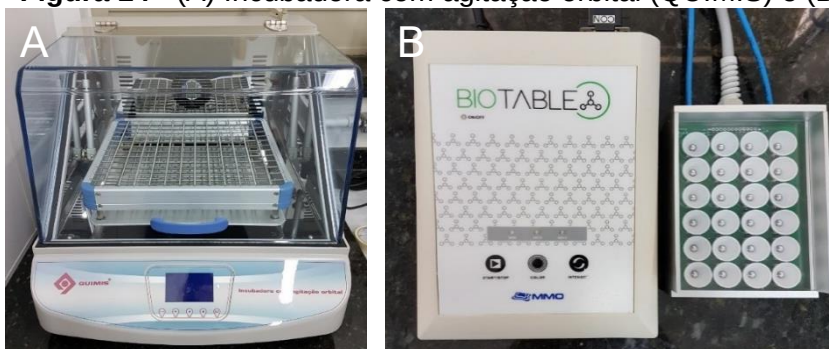
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida (CBM)

Nove poços (n=9) para cada Grupo, controle e experimental foram utilizados para determinação da CIM por meio do método da microdiluição em caldo de acordo com as normas da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Pro Institute) de 2013. Cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços contendo 100 μ L de BHI caldo + sacarose a 1% recebeu 100 μ L do fotossensibilizador conjugado ou não em micelas. Uma suspensão contendo 50 μ L de *Streptococcus mutans*, foi adicionada separadamente em cada poço da placa obtendo-se concentração final da ordem de 1×10^5 células/mL.

Para obter 1×10^5 células/mL a partir da suspensão bacteriana obtida a 1×10^8 células/mL (D.O. de 0.08-1.0), 100 μ L desta foi colocada em tubo Falcon contendo 10mL de PBS, para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC/mL.

O estudo também foi realizado utilizando-se o controle positivo de crescimento, por meio de poços com micro-organismo e sem a solução com fotossensibilizador conjugado ou não, e controle negativo de crescimento, por meio de poços sem adição de micro-organismo. Após período pré-irradiação (5 minutos) para os Grupos IFD, foi realizada irradiação dos poços por sistema de luz LED (Biotable, MMO) (Fig. 14) com dose de $15\text{J}/\text{cm}^2$. Após a IFD, o crescimento bacteriano foi observado após 24h realizando-se a adição de $30\mu\text{L}$ de rezasurina a 0.02%, com incubação das placas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação de 75 r.p.m (Incubadora com agitação orbital, QUIMIS, Modelo: Q816M22, Série 16052406) (Fig.14) por 3-4 horas (CIM). A presença de bactérias viáveis foi observada pela mudança de coloração entre os poços. Os poços com coloração em azul são os que não ocorreu crescimento e os em violeta são os que se observa crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n= 27).

Figura 14 - (A) Incubadora com agitação orbital (QUIMIS) e (B) Biotable (MMO)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Dos orifícios que não mostraram crescimento visível (poços com coloração em azul) ou seja, $\text{DO } 600 \text{ nm} \leq 0.05$, foram retirados $10\mu\text{L}$, os quais foram plaqueados em BHI caldo + sacarose a 1% sendo as placas mantidas a $37^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$ por 48 horas (CBM). A CIM foi definida como a menor concentração de fotossensibilizador conjugado ou não, sem crescimento visível, e a CBM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99.9\%$.

4.6 Formação do Biofilme Bacteriano in vitro em Fundo de Placa de 96 Poços

Foi utilizado o método de formação de biofilmes no fundo de placa de microtitulação com 96 poços (K12-096 Placa para cultivo de células 96 poços fundo chato, Kasvi, China, Lote:171016-078). Primeiramente foram induzidos os biofilmes *single* espécie para a bactéria *Streptococcus mutans* a ser testado. Para induzir o biofilme *single* espécie foram preparados inicialmente 10 mL de BHI caldo + sacarose a 1% e 1000 µL da suspensão bacteriana, sendo em cada poço da placa de 96 poços colocados 200 µL do inóculo. As placas foram cultivadas a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas e para o crescimento e manutenção do biofilme os meios de cultura foram substituídos a cada 24 horas¹⁷¹.

4.7 Avaliação da Citotoxicidade no Escuro do Fotossensibilizador

As soluções com o fotossensibilizador conjugados em micelas ou não, foram incubadas ao biofilme de *Streptococcus mutans* (*single* espécie) durante 5 minutos para detectar qualquer toxicidade inerente aos compostos. Após isso, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) como descrito no item 4.9.

4.8 Inativação Fotodinâmica (IFD)

Após a distribuição da solução com o fotossensibilizador conjugado ou não em micelas de Pluronic® F-127 (200 µL) nos poços de acordo com o Grupo estudado, os biofilmes foram irradiados uniformemente com sistema de iluminação a LED (Biotable, MMO) em comprimento de onda de 460 nm com dose ou densidade de energia de 15 J/cm². Previamente à irradiação o fotossensibilizador permaneceu em contato com os biofilmes por 5 minutos, o que é denominado de tempo pré-irradiação.

Para os Grupos experimentais (G1 e G2) e controles (G3 ao G11) como mostra o Quadro 1, colocamos nos poços em contato com os biofilmes 200 µL de fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic® F-127, 200 µL fotossensibilizador em DMSO 10%, 200 µL micelas de Pluronic® F-127, 200 µL DMSO 10%, 200 µL água ultrapura (Milli-Q) e 200 µL clorexidina 0.2% (Sigma Aldrich, St Louis, MI, EUA).

No Quadro 1 visualizamos a distribuição dos Grupos que foram avaliados neste estudo.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos investigados.

Grupos Investigados	Descrição
G1 – IFD	FSM+L+ (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic + Luz)
G2 – IFD	FSD+L+ (Fotossensibilizador em DMSO 10% + Luz)
G3 – IFD	M+L+ (Micelas de Pluronic + Luz)
G4 – IFD	D+L+ (DMSO 10% + Luz)
G5 – IFD	FS-L+ (Água Milli-Q + Luz)
G6	FSM+L- (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic - Luz)
G7	FSD+L- (Fotossensibilizador em DMSO 10% - Luz)
G8	M+L- (Micelas de Pluronic - Luz)
G9	D+L- (DMSO 10% - Luz)
G10	FS-L- (Água Milli-Q – Luz : Grupo controle negativo)
G11	C+L- (Clorexidina a 0.2%) (Grupo controle positivo)

Fonte: Elaboração própria.

4.9 Avaliação Quantitativa das Células Bacterianas dos Biofilmes

Após os procedimentos experimentais mencionados foram realizados os procedimentos de lavagem dos poços das placas de 96 poços, desagregação do biofilme e sua avaliação quantitativa (contagem de UFC/mL). Para cada Grupo foram realizados os mesmos procedimentos. Para a lavagem das placas de 96 poços foram pipetados 200 µL de PBS em cada poço, sendo repetido por 3 vezes para remover o fotossensibilizador, clorexidina ou DMSO remanescente.

Após lavagem, as placas de 96 poços foram colocadas em cuba ultrassônica (Kondentech, China, Modelo: CD-4820, Série: LUS16010095) para desagregação do biofilme e liberação das células bacterianas que estavam aderidas por 1 minuto e 30 segundos.

O método utilizado para contagem foi o das diluições seriadas a partir da suspensão resultante após a desagregação do biofilme. A partir das suspensões

consideradas iniciais (10^0) para o procedimento de contagem foram feitas 5 diluições, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para cada poço de cada Grupo.

De cada diluição foram pipetados em placas de Petri (90x15mL) 10 μ L sobre meio de cultura apropriado utilizando-se técnica da gota (Ágar Mitis Salivarius, Acumedia - Lote:107418A) com Bacitracina (Sigma Aldrich – Lote:057M4099V) + 1% de Sacarose (Synth, Lote:208786) no biofilme *single espécie*. Após, as placas foram incubadas a 37°C ($\pm 1^\circ$ C) por 48 horas, para ocorrer a multiplicação bacteriana a ponto de surgirem colônias visíveis a olho nu, sendo que cada colônia visível corresponde a uma UFC. Segundo esta técnica de contagem deve-se escolher as placas que apresentam de 30 a 300 UFC para cálculo do número de UFC/mL. Este número é multiplicado pelo fator da diluição para se obter o valor de UFC/mL presentes na solução inicial a partir da qual foram feitas as demais diluições em série. Para cada diluição foram inoculadas 3 gotas para cada poço e foi feita a média entre elas, para calcular com esta média o valor do número de células da solução inicial. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada fotossensibilizador em diferentes ocasiões, totalizando n=27, para cada grupo.

4.10 Análise em Microscópio Confocal a Laser

Para análise em microscópio confocal, os biofilmes foram induzidos como descrito no item 4.6, porém utilizando-se placas contendo 4 compartimentos, para os diferentes grupos, sendo adquiridas em microscópio confocal modelo (CARLS ZEISS LSM 800 com Airyscan com detector GaAsp, lasers 488 nm e 561 nm, Alemanha) no Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara (FOAr)/UNESP (Programa Pro-Infra FINEP 01/2008 nº 01.09.0313.00-REF 0349/09), e sendo analisadas usando o software ZEN Blue 2.3.

Primeiramente, foi removido o meio de cultura (conteúdo de 1000 μ L) de cada compartimento da placa de cultivo. Em seguida foram pipetados 1000 μ L de PBS para fazer a lavagem dos compartimentos da placa de 4 poços, sendo este procedimento repetido por 3 vezes com o objetivo de remover as células bacterianas não aderidas.

Após, foram imersos 150 μ L de corante LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 30 minutos para posterior análise. Este corante é um kit composto por dois corantes que devem ser misturados previamente ao uso, são eles: SYTO 9 (1 μ L) e iodeto de propidium (IP, 1 μ L) para cada 1000 μ L. SYTO 9 cora as bactérias de verde (marcador para ácido nucléico),

enquanto o IP penetra nas membranas danificadas corando-as de vermelho, permitindo identificar, dessa forma, as células viáveis (verdes) e não viáveis (vermelha). Foram utilizadas lentes ópticas com aumento de 20x/0.3 para visualização de toda a amostra e lentes ópticas com aumento de 63x/0.3.

4.11 Análise Estatística

Após avaliação dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ANOVA com correção de Welch, e para comparação múltipla foi utilizado o pós-teste de Pós-hoc de Games-Howell e Pós-hoc de Tukey. Ambos os testes foram realizados ao nível de significância de 5% e intervalo de confiança em 95% para a realização dos referidos cálculos no software SPSS (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) para Windows versão 20.0. com valor de $n=27$ para os experimentos da citotoxicidade no escuro e avaliação quantitativa das células bacterianas dos biofilmes (contagem de UFC/mL).

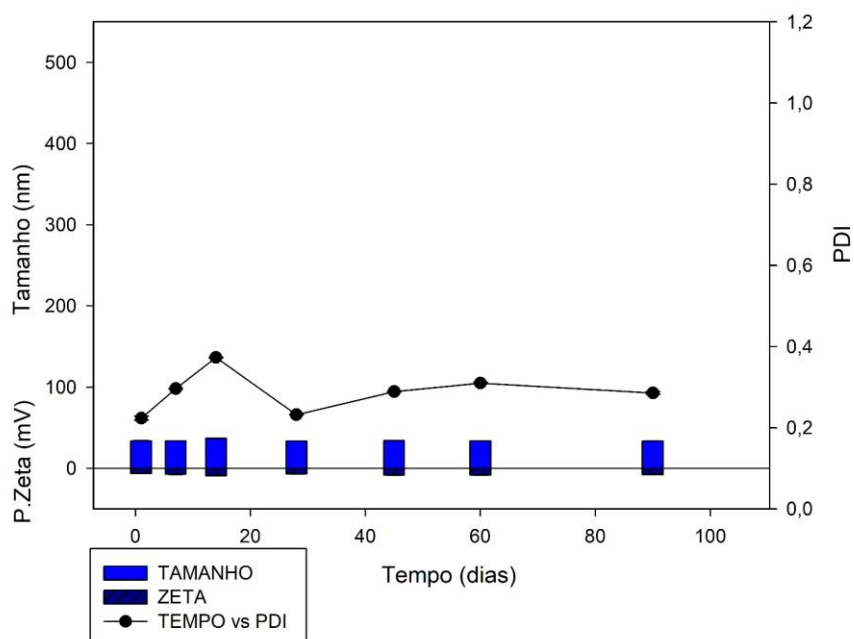
5 RESULTADOS

Após o preparo do fotossensibilizador conjugado a Pluronic® F-127 pelo método de formação de filme polimérico, foi realizada a caracterização das micelas poliméricas nas concentrações de 0.1 e 0.5% de curcumina durante o período de três meses. Em seguida foi selecionada a melhor concentração a ser utilizada na inativação fotodinâmica sobre biofilme de *Streptococcus mutans*, a partir dos resultados obtidos. A caracterização foi realizada empregando-se o Potencial Zeta, determinação do espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão e medidas de absorção óptica.

São consideradas soluções estáveis aquelas com valores do Potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV, enquanto aquelas cujo valor se situa acima de -30 mV e abaixo de +30 mV são instáveis e podem flocular. Para a análise do Potencial Zeta a amostra das micelas poliméricas de Pluronic® F-127 (Fig. 15) apresentou valor igual a -6,22 mV a -9,35 mV durante a caracterização. Esses valores mostram que essas nanopartículas possuem instabilidade no meio aquoso. A concentração de 0,1% do fotossensibilizador conjugado ao Pluronic® F-127, apresentou valor de -5,15 mV a -20,1 mV e -4,47 mV a -26,8 mV para concentração de 0,5%, indicando instabilidade no meio aquoso (Figs. 16 a 17).

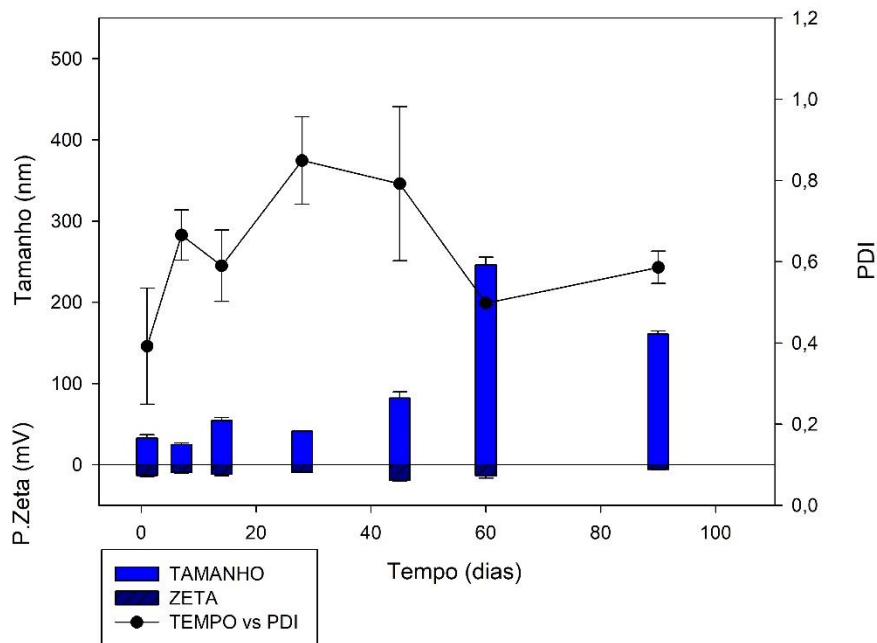
Entretanto, as micelas poliméricas de Pluronic® F-127 conjugadas a 0,5% do fotossensibilizador (Fig. 17), produziu partículas mais estáveis, comparadas com aquelas obtidas nas micelas poliméricas de Pluronic® F-127 (Fig. 15) e 0,1% de fotossensibilizador (Fig. 16).

Figura 15 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de micelas poliméricas de Pluronic® F-127



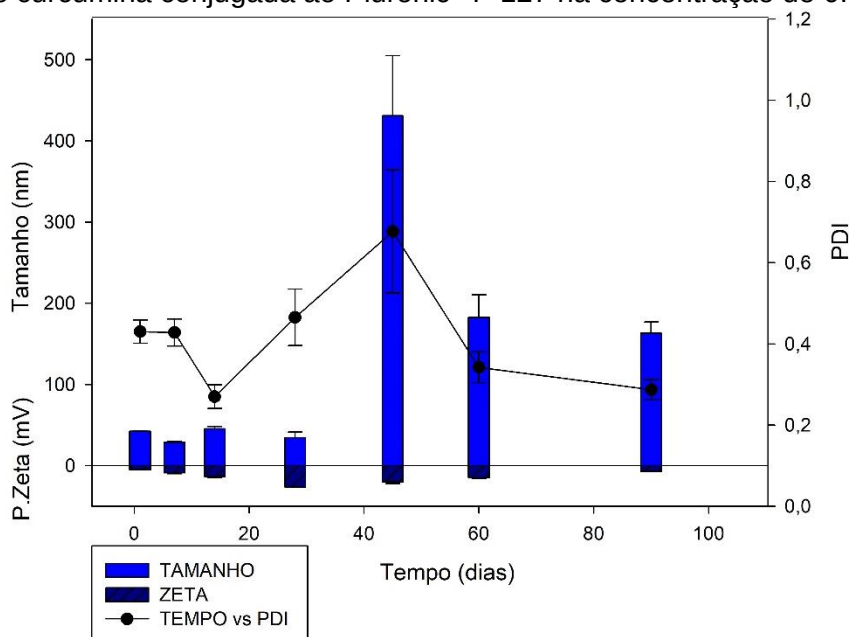
Fonte: Elaboração própria.

Figura 16 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%



Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 - Potencial Zeta, distribuição de tamanho por DLS e PDI para a amostra de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5%



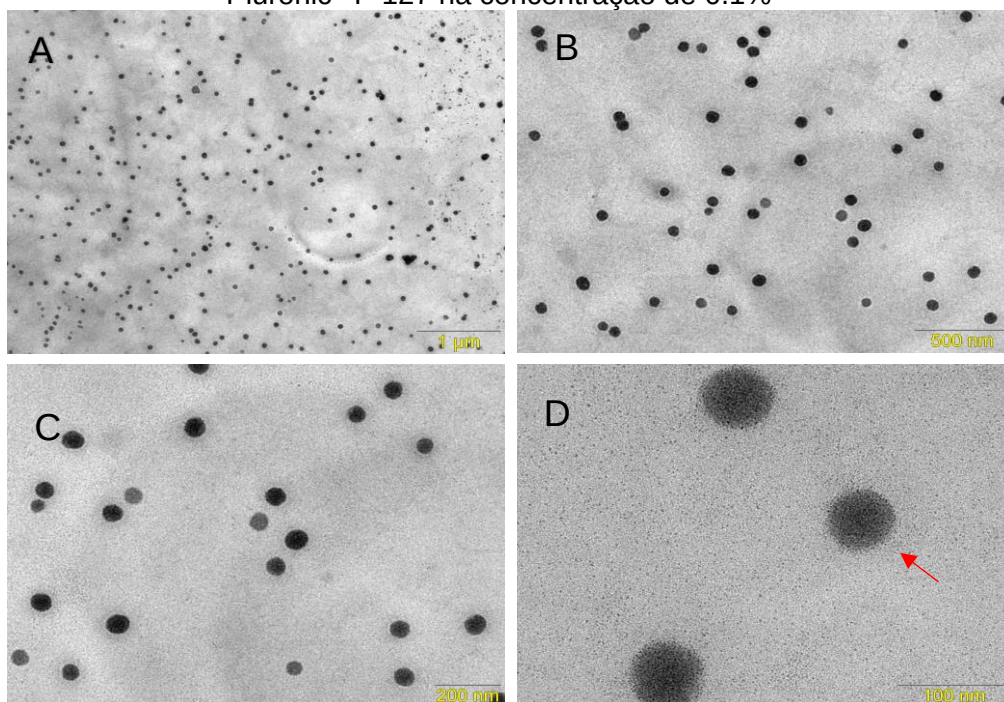
Fonte: Elaboração própria.

A análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi realizada para verificação do tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI), que é um índice de distribuição de tamanho representando a semelhança entre partículas. O valor de PDI mais próximo a 1 indica que os tamanhos das partículas são diferentes.

As amostras apresentaram tamanhos menores a 100 nm em meio aquoso em até 30 dias, sendo ainda consideradas micelas, contudo, após 30 dias apresentaram tamanhos maiores, principalmente na concentração de 0,5%. O PDI da amostra de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5% apresentou PDI aceitável em meio aquoso por até 30 dias (Fig. 17), indicando distribuição de tamanho semelhante entre as partículas, contudo após 30 dias a distribuição se torna heterogênea. Entretanto, a curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,1% apresentou PDI maiores chegando a atingir 0,8 sugerindo a presença de partículas de tamanhos diferentes (Fig. 16).

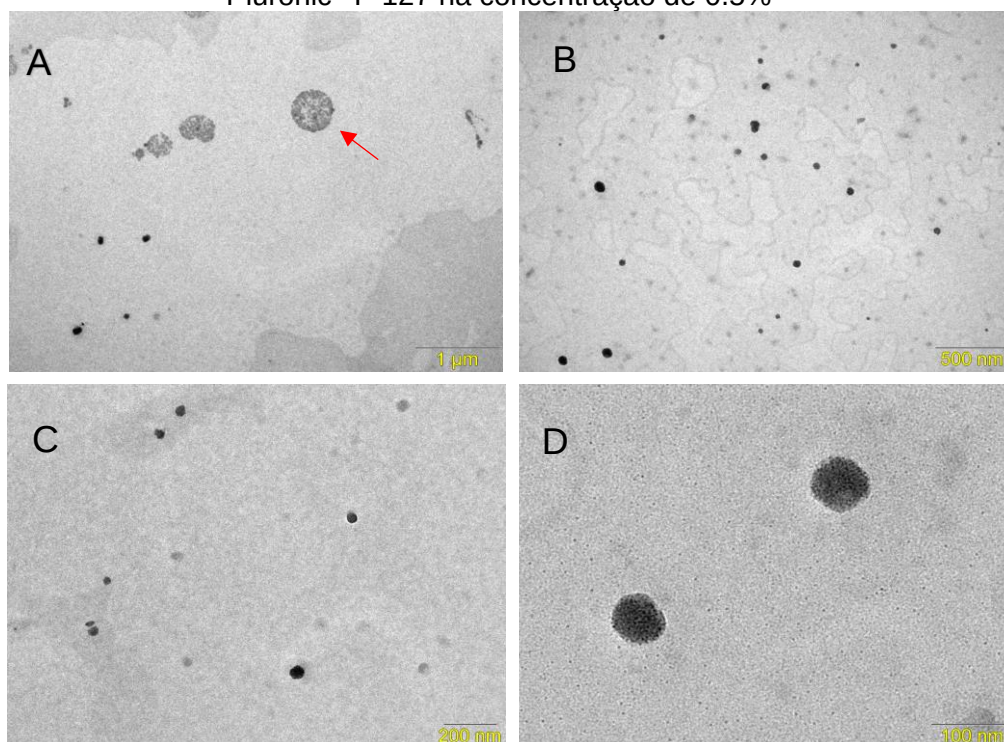
A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica pioneira em nanoescala e, portanto, torna-se importante para avaliar as micelas por serem partículas que estão nessa escala. Assim, a análise da microscopia eletrônica de transmissão (aumentos de 9000x a 380000x) foi realizada para avaliar a morfologia das micelas de Pluronic® F-127 (Figs. 18 a 20).

Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5%



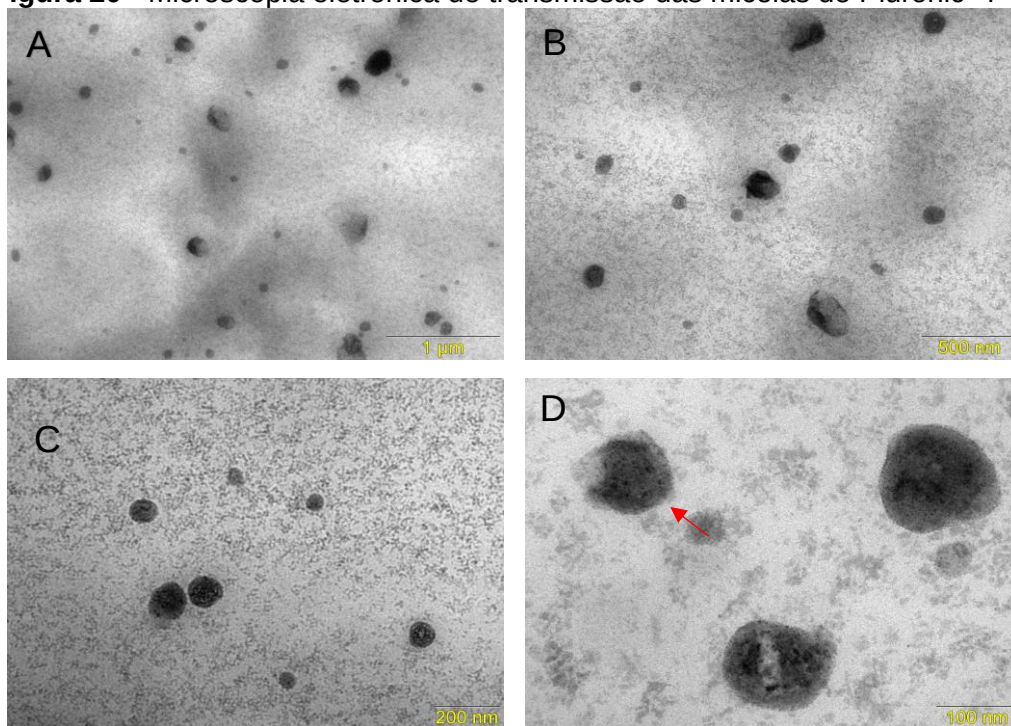
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Na Figura 18D (seta em vermelho) é mais fácil medir o tamanho de cada partícula. As partículas, além de se apresentarem bem definidas e com distribuição

heterogênea, apresentam tamanhos similares com variação de 40 nm a 50 nm. Já as imagens em campo claro/escuro das nanopartículas da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5%, apresentam basicamente as mesmas características da concentração de 0,1%, porém com aglomerados maiores (Fig. 19A, seta em vermelho). É possível observar partículas bem definidas, de distribuição heterogênea e de tamanhos similares com variação de 50 nm a 80 nm.

Entretanto, os aglomerados que podem ser observados na Figura 19A, podem representar o titânio proveniente do dispensador do tipo mecânico (rotor estator) modelo IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic no processo de confecção da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127, ou mais provavelmente à aglomeração das próprias micelas por possuírem característica de estrutura anfifílica (moléculas que possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica). As micelas de Pluronic possuem grupos oxipropilênicos na parte interna correspondente ao núcleo, sendo mais hidrofóbica. O núcleo é o local onde a curcumina se liga, sendo assim, como as micelas não conseguem incorporar grande quantidade de curcumina na sua estrutura formam-se os aglomerados maiores.

Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão das micelas de Pluronic® F-127



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Entretanto, nas nanopartículas das micelas de Pluronic® F-127 (Fig. 20) é possível observar partículas grandes bem definidas, de distribuição heterogênea.

Além disso as partículas apresentam tamanhos com variação de 80 nm a 100 nm. Apesar do tamanho maior comparada as nanopartículas de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,1 e 0,5%, essas partículas ainda se apresentam na nanoescala e podem ser classificadas como micelas (10-100 nm).

Um espectro obtido no ultravioleta-visível é um gráfico da absorbância versus o comprimento de onda na faixa do ultravioleta e/ou visível. Os espectros de absorção possibilitam identificar substâncias, sendo as curvas de absorção uma espécie de “impressão digital” que caracteriza a presença de um composto.

As soluções contendo o fotossensibilizador curcumina (0,1 e 0,5%) conjugada ou não ao Pluronic® F-127 foram preparadas minutos antes do início da obtenção das medidas de absorção óptica, com o objetivo de evitar a possível degradação. Após a diluição (1/10) de cada solução, três mililitros (3 mL) foram analisados na região de 200-800 nm, antes e após a irradiação com LED em comprimento de onda azul, ao decorrer de três meses (Figs. 21 a 28).

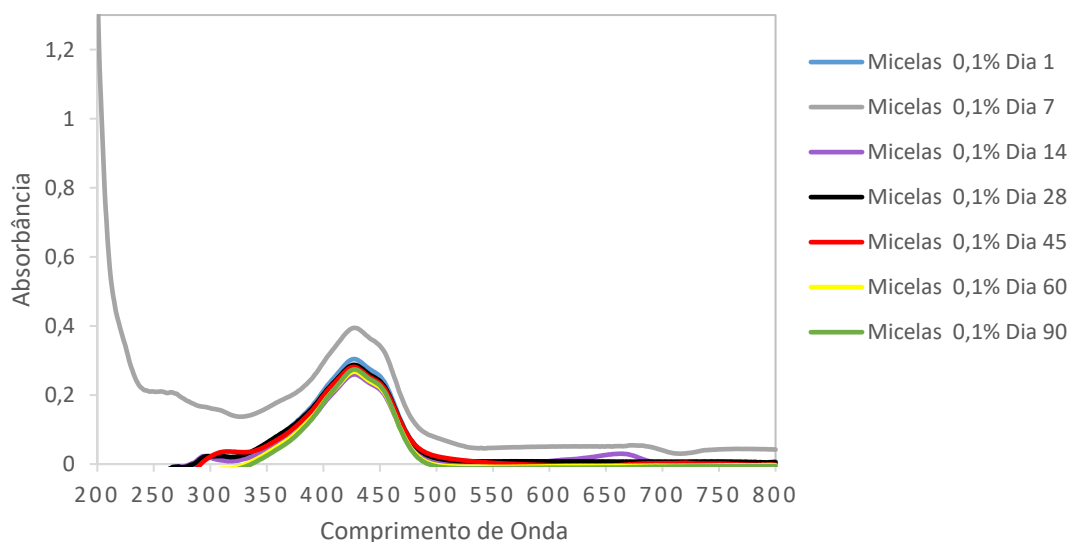
As absorbâncias obtidas em função do tempo não apresentaram perfil constante na região entre 300 e 500 nm, o que sugere instabilidade das soluções contendo o fotossensibilizador em meio aquoso (Figs. 21,23,25 e 27). Entretanto, apesar da instabilidade, é possível identificar a presença do composto curcumina ao longo dos 3 meses de caracterização, sem ocorrer a degradação antes da utilização do LED (Figs. 21,23,25 e 27) mostrando potencial para utilização das soluções na inativação fotodinâmica. Contudo, é visível a maior estabilidade das soluções contendo curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 (0,1 e 0,5%), quando comparadas as soluções de curcumina (livre) em DMSO (0,1 e 0,5%), além disso o sistema obtido foi capaz de aumentar a solubilidade do fotossensibilizador como também preveniu a agregação e manteve as propriedades fotofísicas. Assim, torna-se factível a utilização do Pluronic® F-127 como alternativa viável para incorporação da curcumina a ser utilizada na inativação fotodinâmica.

Os espectros na região do UV-Vis da curcumina (0,1 e 0,5%) conjugada ou não ao Pluronic® F-127 (Figs 21, 23, 25 e 27) obtidos comprovam o uso do comprimento de onda específico (azul) a ser utilizado nas soluções contendo curcumina na inativação fotodinâmica, ou seja, onde comprimento de onda da curcumina absorve a luz antes da irradiação.

Os dados também mostram estabilidade da fotodegradação quando a curcumina (0,1 e 0,5%) está conjugada ao Pluronic® F-127 (Figs 22 e 24) quando

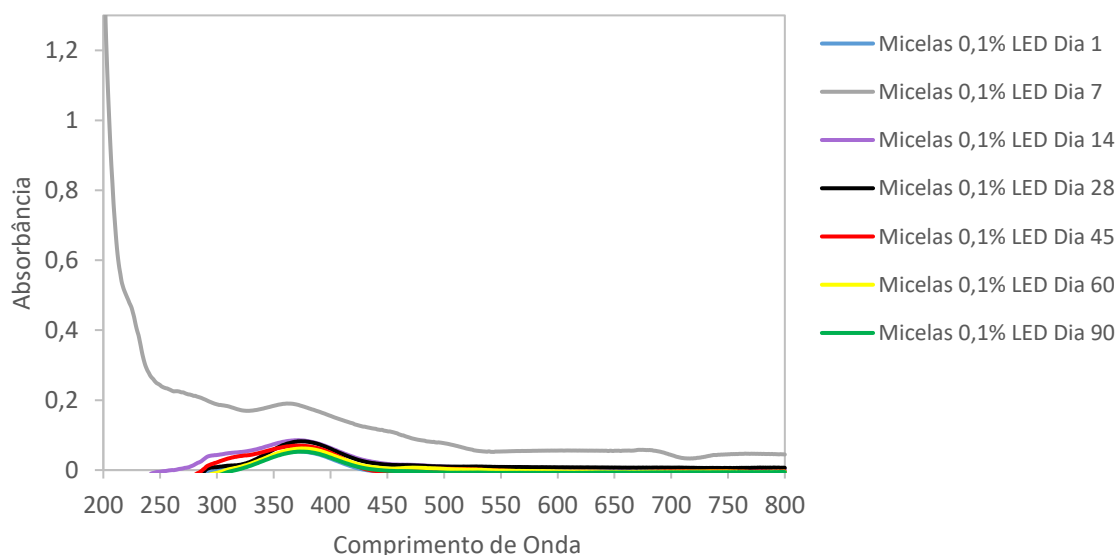
comparados à curcumina não conjugada ao Pluronic® F-127 (Figs. 26 e 28) após a irradiação, pode-se observar que as micelas de Pluronic® F-127 proporcionam resistência maior à fotodegradação do fotossensibilizador.

Figura 21 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.1%



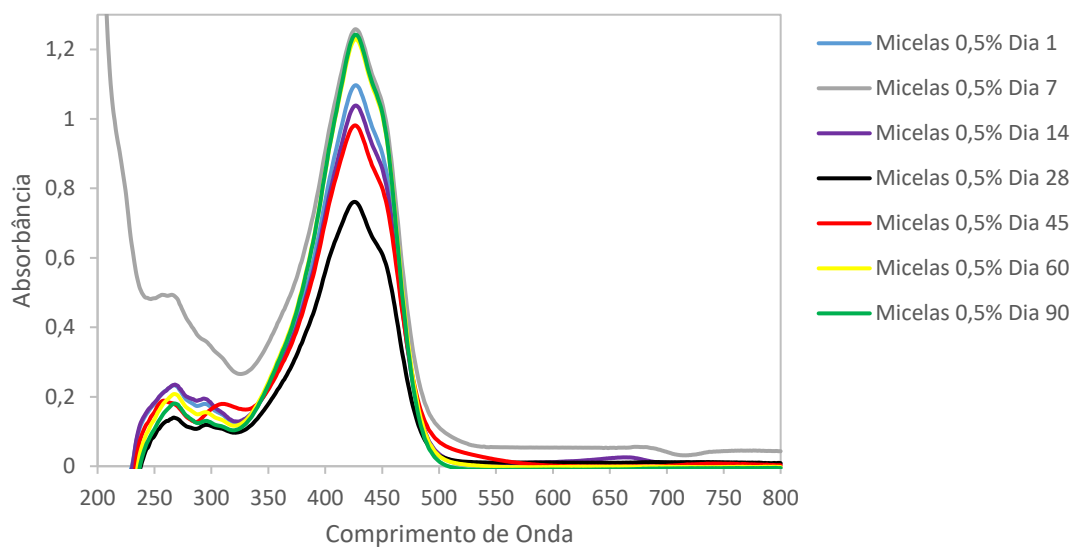
Fonte: Elaboração própria.

Figura 22 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,1% após a irradiação com luz LED



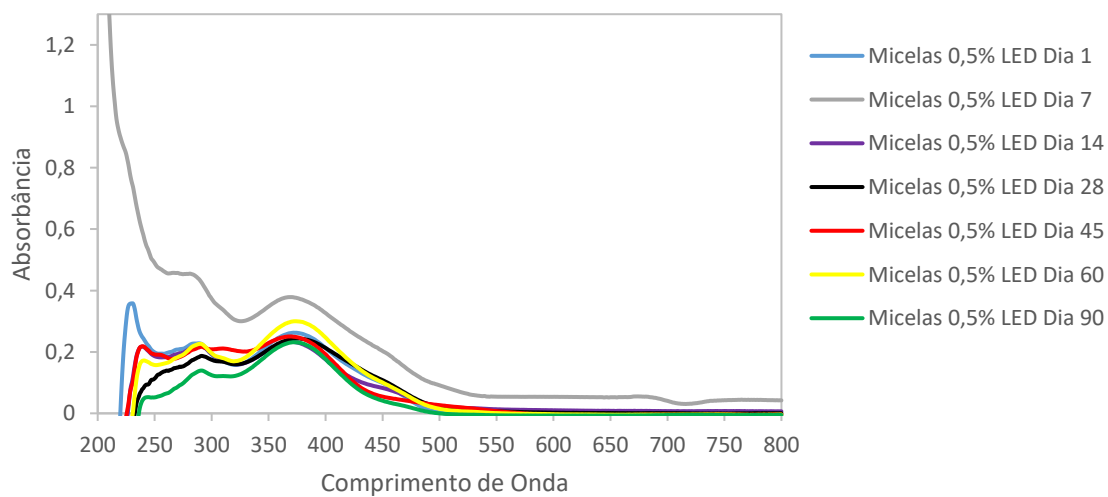
Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5%



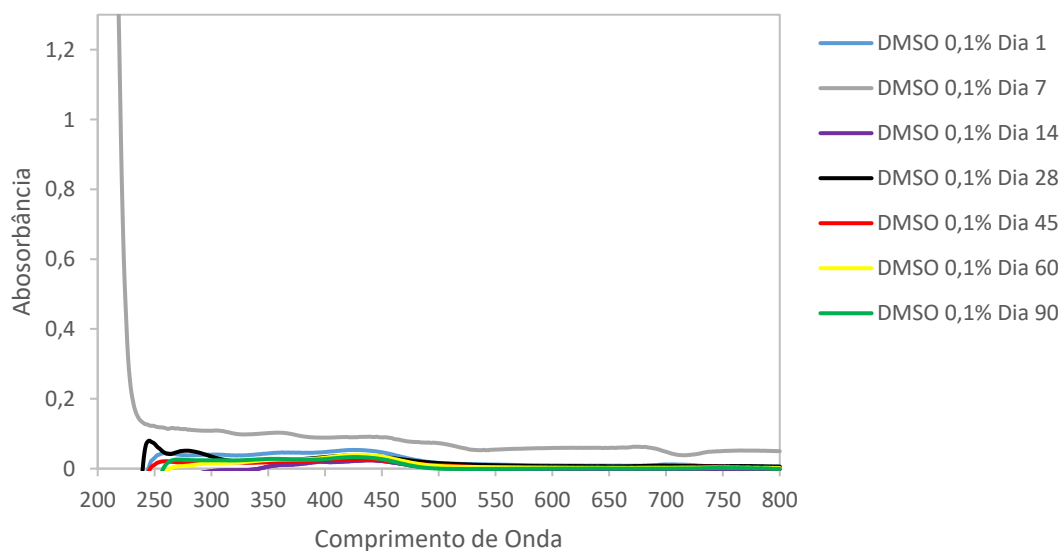
Fonte: Elaboração própria.

Figura 24 - Espectros na região do UV-vis da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0.5% após a irradiação com luz LED



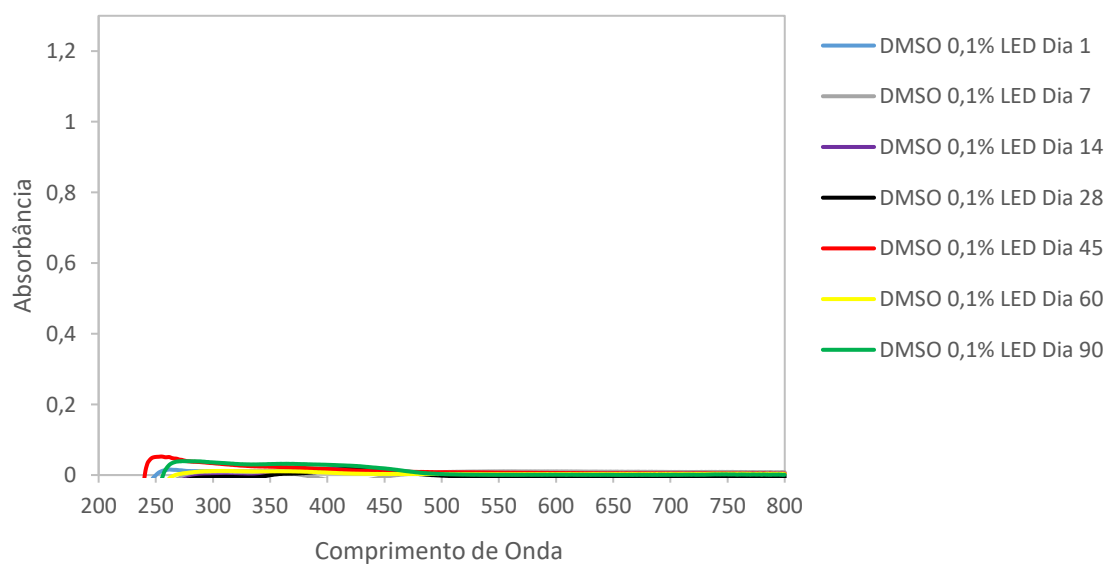
Fonte: Elaboração própria.

Figura 25 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.1%



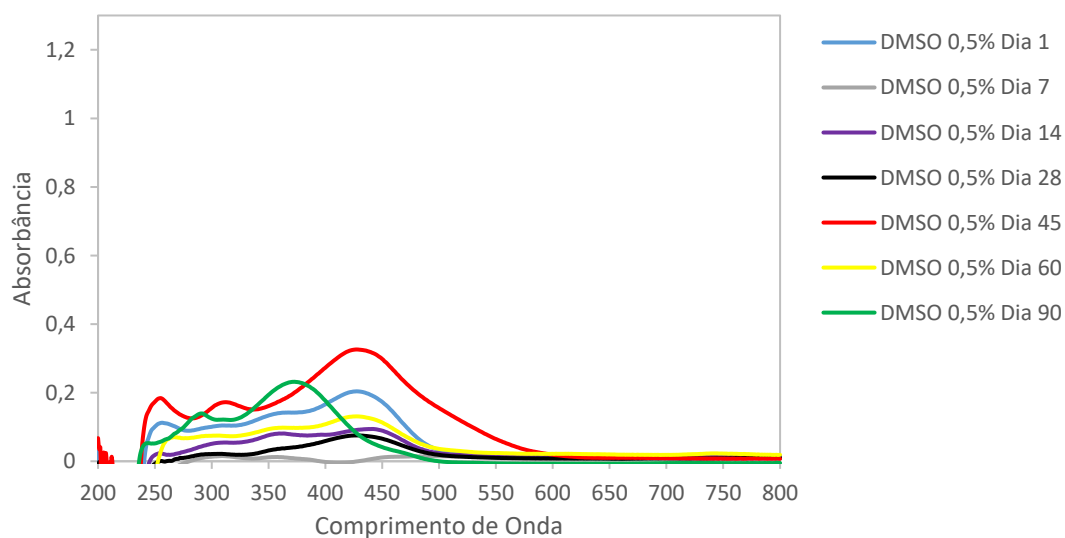
Fonte: Elaboração própria.

Figura 26 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.1% após a irradiação com luz LED



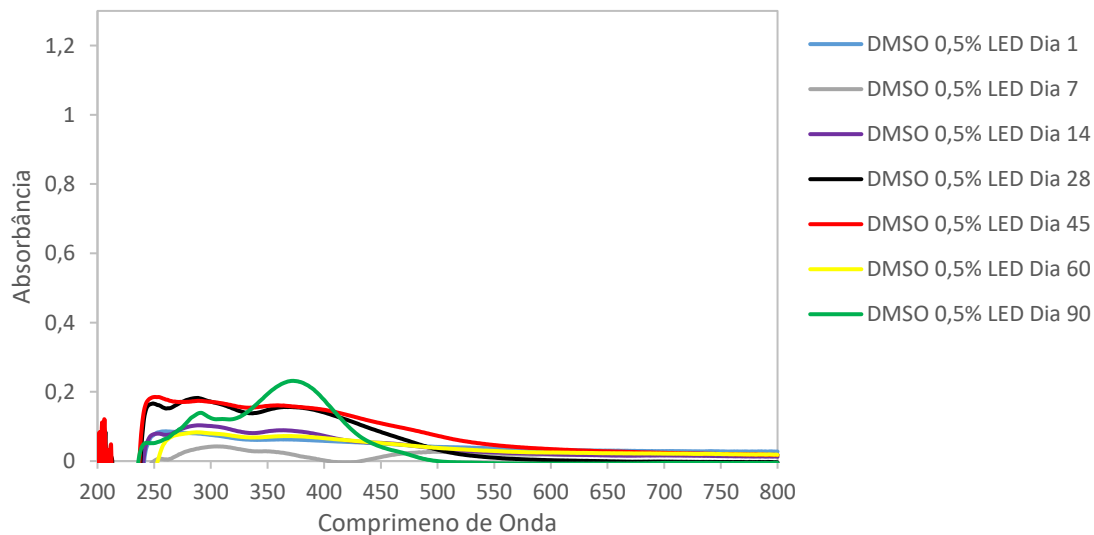
Fonte: Elaboração própria.

Figura 27 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.5%



Fonte: Elaboração própria.

Figura 28 - Espectros na região do UV-vis da curcumina em DMSO na concentração de 0.5% após a irradiação com luz LED



Fonte: Elaboração própria.

Após a caracterização, foi selecionada a maior concentração de curcumina que as micelas foram capazes de incorporar. Para a determinação da concentração inibitória mínima e determinação da concentração bactericida foi observado que a bactéria analisada para o fotossensibilizador não conjugado ao Pluronic® F-127 apresentou atividade inibitória na diluição de 270 μ M. Entretanto, não se obteve a

concentração bactericida, definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99,9\%$ devido ao crescimento bacteriano nas placas de petri (Figs. 29 e 30).

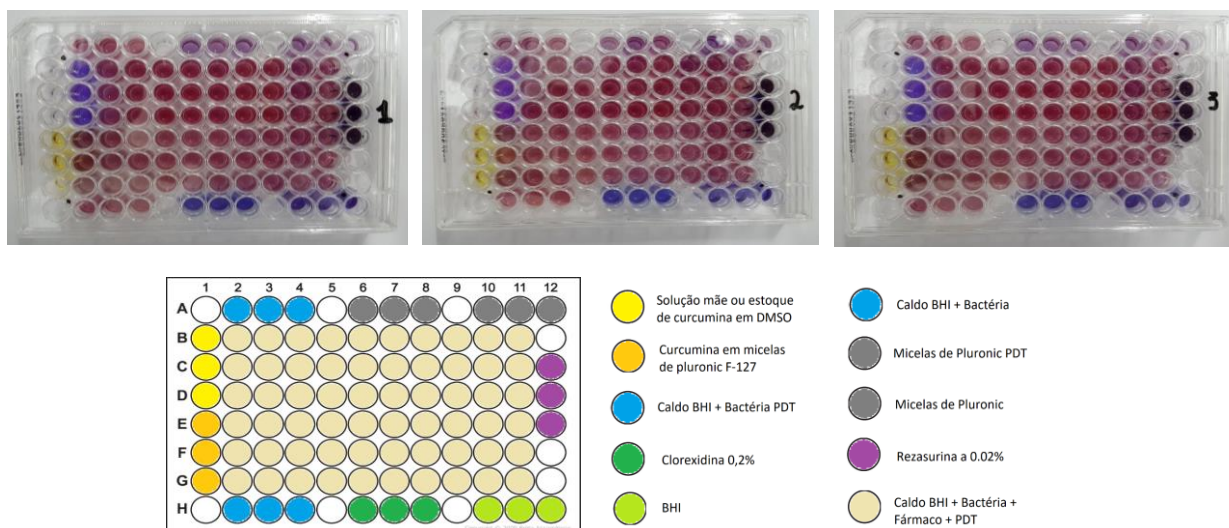
Já o resultado da atividade antimicrobiana da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5% pelo método da microdiluição em caldo, não resultou atividade inibitória para a bactéria analisada. Sendo assim, não se obteve a concentração bactericida definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99,9\%$.

Figura 29 - Crescimento bacteriano nas placas de petri na diluição de 270 μM



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 30 - Determinação da concentração inibitória e concentração bactericida mínima

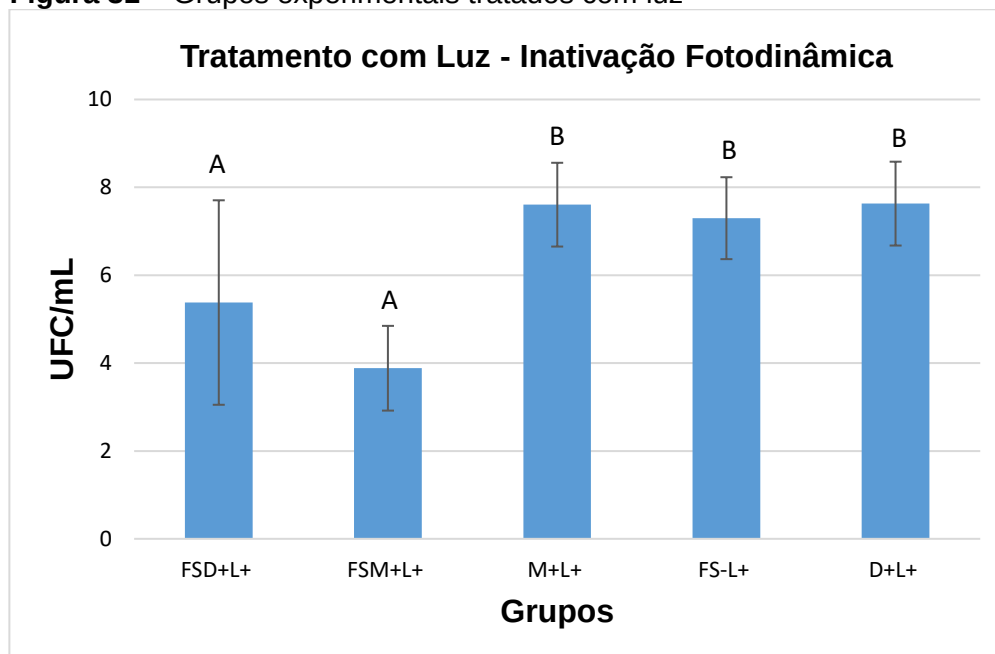


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após a determinação da concentração inibitória mínima, e determinação da concentração bactericida realizou-se a avaliação quantitativa das células bacterianas

UFC/mL para os grupos da citotoxicidade no escuro e da inativação fotodinâmica (Figs. 31 e 32).

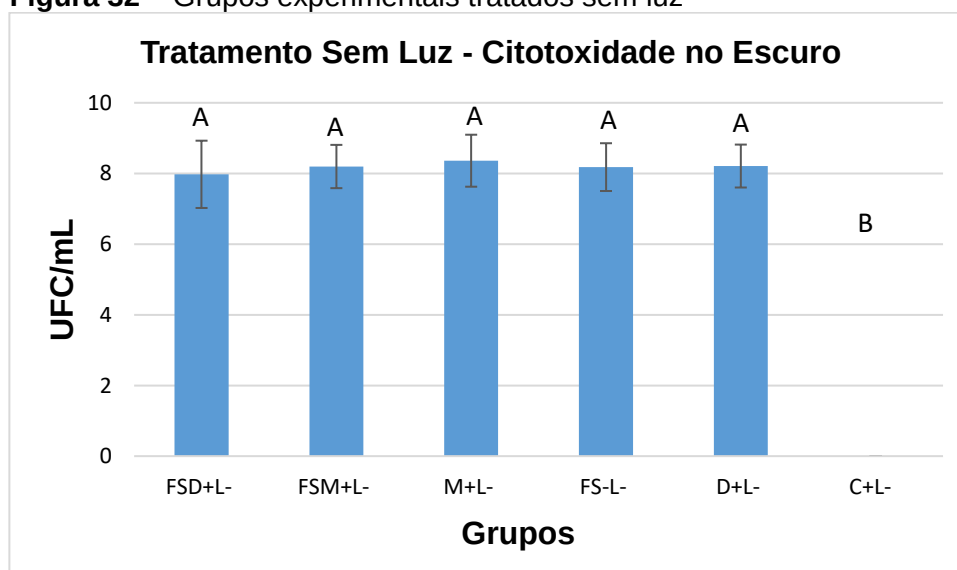
Figura 31 – Grupos experimentais tratados com luz



FSD+L+ (Fotossensibilizador em DMSO 10% + Luz);
 FSM+L+ (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic + Luz);
 M+L+ (Micelas de Pluronic + Luz);
 FS-L+ (Água Milli-Q+ Luz);
 D+L+ (DMSO 10% + Luz).

Fonte: Elaboração própria.

Os dados obtidos para os experimentos tratados com luz (Fig. 31) a amostra foi considerada como distribuição normal, e assim aplicou-se o teste paramétrico de ANOVA. Entretanto, devido os dados serem heterocedásticos com valor de $\alpha < 0,05$ utilizou-se ANOVA com correção de Welch. O Pós-hoc teste de Games-Howell foi aplicado para determinar quais grupos são estatisticamente diferentes e/ou estatisticamente semelhantes. Os resultados mostram que os grupos semelhantes são FSM+L+ e FSD+L+, sendo diferentes dos M+L+, D+L+ e FS-L+ (Fig. 31) estatisticamente. O tratamento realizado resultou em uma redução maior para o grupo FSM+L+.

Figura 32 – Grupos experimentais tratados sem luz

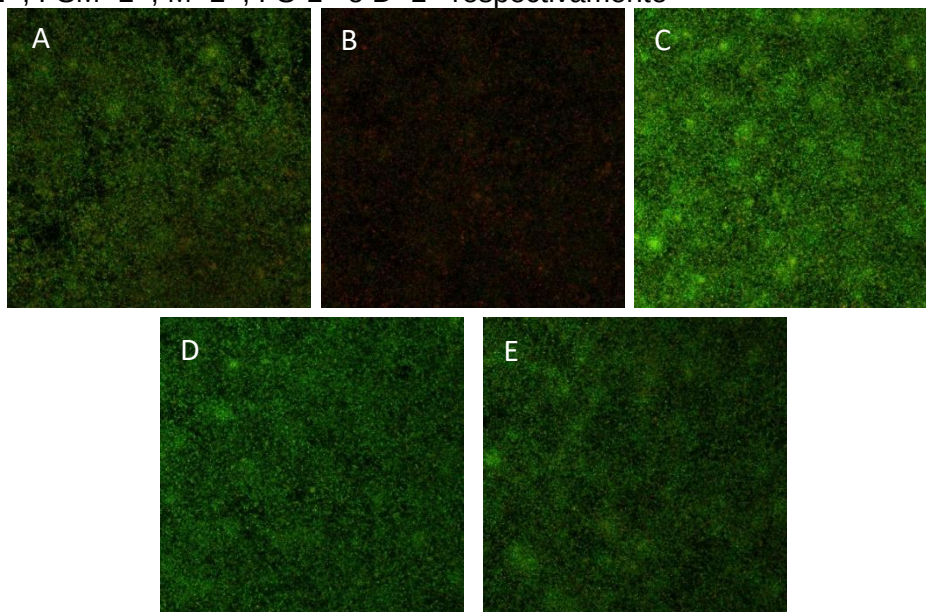
FSD+L- (Fotossensibilizador em DMSO 10% - Luz);
 FSM+L- (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic - Luz);
 M+L- (Micelas de Pluronic - Luz);
 FS-L- (Água Milli-Q – Luz : Grupo controle negativo);
 D+L- (DMSO 10% - Luz);
 C+L- (Clorexidina a 0.2%) (Grupo controle positivo).

Fonte: Elaboração própria.

Já para os experimentos da citotoxicidade no escuro a amostra foi considerada com distribuição normal, e assim aplicou-se o teste paramétrico de ANOVA, com o valor de $\alpha > 0,05$ e os dados apresentaram homocedasticidade. Foi usado o teste de Pós-hoc de Tukey, sendo aplicado para determinar quais grupos foram estatisticamente diferentes e/ou estatisticamente semelhantes. Os resultados mostram que apenas o grupo C+L- foi estatisticamente diferente dos demais grupos (Fig. 32).

A análise em microscopia confocal a laser foi realizada no biofilme para os grupos (Figs. 33 a 36). As imagens comprovam os resultados obtidos UFC/mL, podendo observar a maior quantidade de bactérias mortas no grupo B) FSM+L+ e F) C+L- (Figs. 33 a 36).

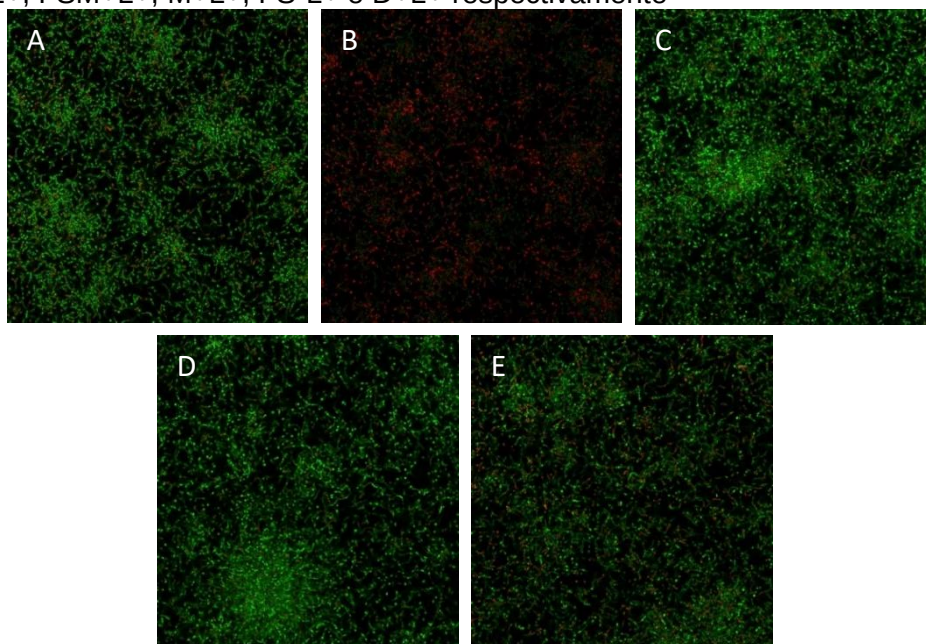
Figura 33 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 20x/0.3 dos biofilmes após inativação fotodinâmica. As letras A, B, C, D e E correspondem aos grupos FSD+L+, FSM+L+, M+L+, FS-L+ e D+L+ respectivamente



A) FSD+L+ (Fotossensibilizador em DMSO 10% + Luz), B) FSM+L+ (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic + Luz), C) M+L+ (Micelas de Pluronic + Luz), D) FS-L+ (Água Milli-Q + Luz) e E) D+L+ (DMSO 10% + Luz).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

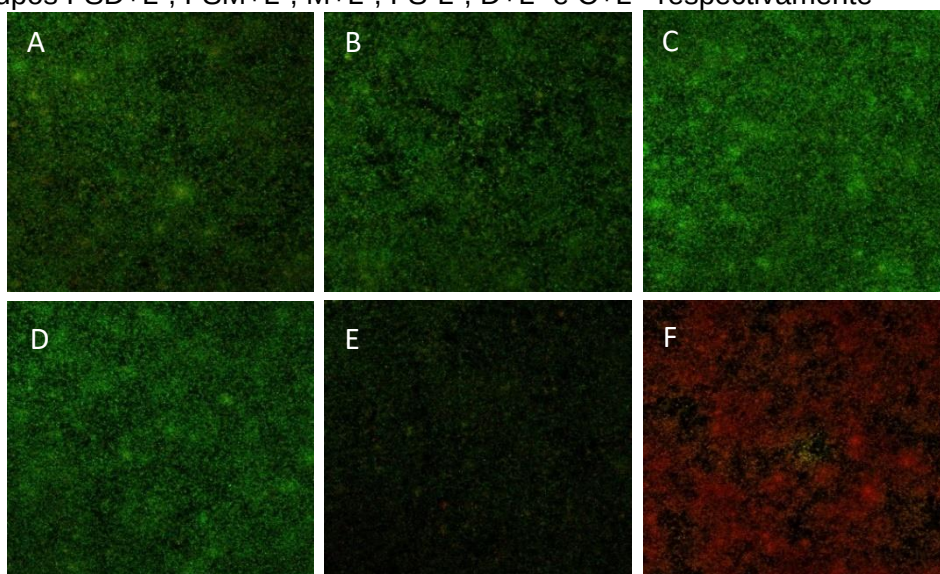
Figura 34 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 63x/0.3 dos biofilmes após inativação fotodinâmica. As letras A, B, C, D e E correspondem aos grupos FSD+L+, FSM+L+, M+L+, FS-L+ e D+L+ respectivamente



A) FSD+L+ (Fotossensibilizador em DMSO 10% + Luz), B) FSM+L+ (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic + Luz), C) M+L+ (Micelas de Pluronic + Luz), D) FS-L+ (Água Milli-Q + Luz) e E) D+L+ (DMSO 10% + Luz).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

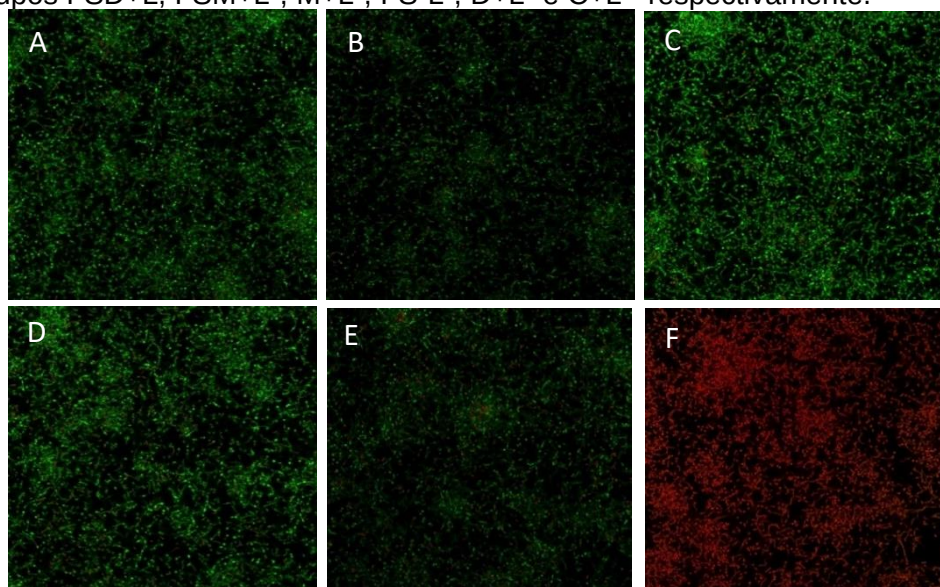
Figura 35 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 20x/0.3 dos biofilmes para os grupos de citotoxicidade no escuro. As letras A, B, C, D, E, e F correspondem aos grupos FSD+L-, FSM+L-, M+L-, FS-L-, D+L- e C+L- respectivamente



A) FSD+L- (Fotossensibilizador em DMSO 10% - Luz), B) FSM+L- (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic - Luz), C) M+L- (Micelas de Pluronic - Luz), D) FS-L- (Água Milli-Q – Luz : Grupo controle negativo), E) D+L- (DMSO 10% - Luz) e F) C+L- (Clorexidina a 0.2%) (Grupo controle positivo).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 36 - Imagens de microscopia confocal a laser com aumento de 63x/0.3 dos biofilmes para os grupos de citotoxicidade no escuro. As letras A, B, C, D, E e F correspondem aos grupos FSD+L-, FSM+L-, M+L-, FS-L-, D+L- e C+L- respectivamente.



A) FSD+L- (Fotossensibilizador em DMSO 10% - Luz), B) FSM+L- (Fotossensibilizador conjugado a micelas de Pluronic - Luz), C) M+L- (Micelas de Pluronic - Luz), D) FS-L- (Água Milli-Q – Luz : Grupo controle negativo), E) D+L- (DMSO 10% - Luz) e F) C+L- (Clorexidina a 0.2%) (Grupo controle positivo).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

Os tratamentos atuais para a cárie dentária nem sempre são eficazes para remover com sucesso todos os micro-organismos que causam a doença⁴⁷. Para eliminar bactérias e prevenir a cárie dentária, diferentes métodos são recomendados, como por exemplo: materiais antibacterianos, desinfetantes de cavidades, sistemas adesivos antibacterianos, materiais restauradores, condicionamento ácido e o uso de laser e ozônio⁴⁷. O uso de desinfecção fotoativada que é conhecida também como inativação fotodinâmica é um método de eliminação de bactérias residuais na cavidade previamente à restauração, atualmente é uma das técnicas que está se tornando bastante popular⁴⁷. Já se sabe que as bactérias estão se tornando cada vez mais resistentes ao longo dos anos às terapias antibacterianas convencionais. Isto levou ao surgimento de tratamentos alternativos, como à aplicação da inativação fotodinâmica por se tratar de uma técnica promissora^{85,121}.

A maioria dos fotossensibilizadores utilizados na IFD são praticamente insolúveis em meio aquoso, necessitando a incorporação prévia a solventes como etanol e DMSO^{18,20–24}, o que pode dificultar seu uso clínico. Alguns estudos tentaram desenvolver um método capaz de solubilizar a curcumina sem a necessidade desses solventes^{99,104,105,107,108,130,134,142}. Os nossos resultados foram diferentes desses trabalhos, seja pela metodologia empregada ou pelos seus objetivos secundários propostos, porém todos esses estudos tentaram também melhorar as propriedades físico-químicas da curcumina para seu uso clínico, como por exemplo, a sua encapsulação (desenvolvimento de um sistema de nanopartículas) para melhorar a capacidade de penetrar nos tecidos, tempo de retenção, aumento a estabilidade, aumento da biodisponibilidade e melhoria das atividades farmacológicas. Entretanto, antes de avaliar a efetividade do uso das nanopartículas de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 sobre biofilme de *Streptococcus mutans* é necessário realizar uma série de análises das nanopartículas, como por exemplo a análise do Potencial Zeta, que tem a finalidade de avaliar a carga superficial das partículas, o que implica na estabilidade das formulações¹⁶⁹. O Potencial Zeta sendo uma medida da carga de superfície da partícula em meio específico que serve para prever interações entre as partículas em suspensão¹⁶⁹. A manipulação quando possível dessa carga de superfície é uma maneira de melhorar a estabilidade de formulações farmacêuticas¹⁷⁰. Existem alguns estudos sobre a obtenção de nanopartículas de curcumina por meio

de diferentes polímeros e métodos^{99,104,105,107,108,130,134,142}. As propriedades físico-químicas obtidas no presente estudo foram, em geral, semelhantes às obtidas por esses métodos^{99,104,105,107,108,130,134,142}. Entretanto, em algumas formulações sintetizadas pelos métodos diferentes, o Potencial Zeta apresentou-se instável^{99,104,105,134} e em outros estudos estável^{104,105}.

Estudos que obtiveram formulações contendo nanopartículas com curcumina apresentaram valores de carga de superfície estáveis -30 mV^{104} , $58,3 (\pm 2,1) \text{ mV}^{99}$, e em outros estudos foram encontrados valores de Potencial Zeta $-35.2 (\pm 6,52) \text{ mV}^{107}$, $+32.0 (\pm 1.45) \text{ mV}^{107}$, $-30 (\pm 12,58) \text{ mV}^{108}$ e $+35 (\pm 7.23) \text{ mV}^{108}$. Entretanto, observa-se que as nanopartículas sintetizadas neste estudo possuem Potencial Zeta com cargas superficiais com instabilidade das partículas, semelhante a outros estudos que apresentaram valores de carga de superfície instáveis $-12,5 (\pm 2,8) \text{ mV}^{130}$, $18 (\pm 0.7 \text{ mV}) \text{ mV}^{105}$, $-23,2 (\pm 3,8) \text{ mV}^{134}$, $-4,1 (\pm 0,1) \text{ mV}^{99}$, $-24,8 (\pm 1,9) \text{ mV}^{99}$, $-22,4 (\pm 1,9) \text{ mV}^{99}$ contendo curcumina no meio aquoso.

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é um método preciso, confiável, fácil de reproduzir e que utiliza pequena quantidade da amostra para se obter o tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI)^{130,165}. Micelas poliméricas são consideradas nanopartículas que podem ter tamanho entre 10 e 100 nm^{131,153}. Alguns estudos que obtiveram formulações contendo nanopartículas com curcumina observaram o tamanho das partículas por DLS em meio aquoso^{99,104,105,107,108,130,134,143}. Esses estudos obtiveram tamanho de partículas entre $100 (\pm 20) \text{ nm}^{104}$, $150 (\pm 30) \text{ nm}^{104}$, $163 (\pm 8,1) \text{ nm}^{130}$, $110.5 (\pm 5.6) \text{ nm}^{105}$, $176,5 (\pm 7.0) \text{ nm}^{134}$, $242 (\pm 2) \text{ nm}^{99}$, $230 (\pm 6) \text{ nm}^{99}$, $208 (\pm 2) \text{ nm}^{99}$, $121 (\pm 3) \text{ nm}^{99}$ e $222 (\pm 14) \text{ nm}^{143}$ e em estudos mais recentes $237.9 (\pm 34.2) \text{ nm}^{107}$, $249.0 (\pm 47.6) \text{ nm}^{107}$, $225 (\pm 60,38) \text{ nm}^{108}$ e $248 (\pm 86,39) \text{ nm}^{108}$. Apesar de não serem consideradas micelas (10 a 100 nm), essas formulações ainda são consideradas nanopartículas por estarem na escala nanométrica, contudo essas nanopartículas foram sintetizadas por métodos diferentes.

Há um estudo que mostra que nanopartículas menores que 200 nm são distribuídas em tumores com mais eficiência do que nanopartículas maiores¹⁵². Na maioria das vezes em um nanossistema, o tamanho da partícula influencia na farmacocinética da formulação, incluindo o tempo de circulação, absorção e distribuição do fármaco, o que se torna extremamente importante para a inativação fotodinâmica ter essa característica (menor que 200 nm). As nanopartículas de

curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 apresentaram tamanhos menores (30 a 55 nm) em meio aquoso em até 30 dias. Contudo, as nanopartículas preparadas após 30 dias apresentaram tamanhos maiores e parecidas com estudos citados ^{99,104,105,107,108,130,134,143}. As micelas de Pluronic® F-127 observadas na microscopia eletrônica de transmissão revelou nanopartículas esféricas ou elipsoidais, com estrutura superficial irregular e tamanho abaixo de 200 nm, sendo semelhante aos dados determinados pelo DLS.

PDI mais próximo a 1 indica distribuição de tamanho desigual entre as partículas que pode prejudicar a eficiência terapêutica¹⁵⁵. Estudos realizados com nanopartículas carregadas com curcumina obtiveram PDI de 0,053 ($\pm 0,021$)¹³⁰, 0,105 ($\pm 0,025$)¹³⁴, 0,08 ($\pm 0,8$)¹⁰⁷, 0,042 ($\pm 0,01$)¹⁴², 0,077 ($\pm 0,01$)¹⁴², os resultados encontrados nas nanopartículas de curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5% foram semelhantes aos encontrados nestes mesmos estudos^{107,130,134,142} e em outros estudos que obteve-se o PDI de 0,31 ($\pm 0,04$)⁹⁹, 0,21 ($\pm 0,09$)¹⁰⁸, 0,15 ($\pm 0,06$)¹⁰⁸, 0,20 ($\pm 0,07$)¹⁰⁷, 0,21 ($\pm 0,09$)¹⁰⁸, 0,17 ($\pm 0,02$)⁹⁹, 0,15 ($\pm 0,05$)⁹⁹, 0,15 ($\pm 0,02$)⁹⁹. Os valores de tamanho médio, PDI e Potencial Zeta mudaram ao longo do tempo após a síntese da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5%, porém, pode-se sugerir que essa formulação pode ser estável por curto período após a síntese.

Todos os fotossensibilizadores usados na inativação fotodinâmica sofrem degradação pela luz⁹⁰⁻⁹⁵, entretanto essa degradação deve ser avaliada afim de averiguar se essa degradação irá ou não ser significativa. Existem várias terminologias utilizadas referentes à degradação dos fotossensibilizadores, sendo que os mais frequentemente usados são “*photofading*” e “*photobleaching*”^{90,91}. Essa terminologia é caracterizada como a diminuição da absorção e diminuição da intensidade de fluorescência dos fotossensibilizadores, influenciando dessa forma no mecanismo de ação durante a inativação fotodinâmica⁹⁰⁻⁹⁵.

A absorbância máxima da curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 nas concentrações 0,1 e 0,5% foram de 0,39 e 1,2 a 427 nm de comprimento de onda, respectivamente, no decorrer de 3 meses. Já a curcumina em DMSO (não conjugada) nas concentrações 0,1 e 0,5% foram de 0,018 e 0,32 a 427 nm de comprimento de onda, respectivamente. Esses resultados corroboram com outros estudos, em que a curcumina absorve a luz azul no comprimento de onda entre 400 e 470 nm^{24,122}. É

importante enfatizar sobre a relevância da fotodegradação que ocorre nos fotossensibilizadores, pois influencia diretamente no mecanismo de ação durante a inativação fotodinâmica, e que essa inativação só ocorre devido a interação com a luz⁹⁰. Além disso, para ocorrer a fotodegradação é necessário a presença do oxigênio, sendo um processo oxidativo e que envolve oxigênio siglete ou radical de espécies reativas de oxigênio⁹⁰.

Os fotossensibilizadores se apresentam diferentes um do outro em relação à fotodegradação, apresentando-se estáveis (maior resistência à fotodegradação) ou instáveis (menor resistência à fotodegradação)⁹³. Entretanto, a fotodegradação dos fotossensibilizadores utilizados na inativação fotodinâmica podem apresentar vantagens e desvantagens, sendo que a inativação bacteriana pode não ser completa caso o fotossensibilizador sofra rápida fotodegradação durante a iluminação, o que leva à diminuição da concentração do fotossensibilizador no local aonde está sendo realizado a inativação fotodinâmica^{90,92,93,95}. Contudo, essa fotodegradação pode ser corrigida pela diminuição da dose de luz, seguida de múltiplas sessões de irradiação, causando assim a morte celular^{90,92,93,95}.

Para o teste de fotodegradação a curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 nas concentrações 0,1 e 0,5% mostraram redução na faixa de absorbância em torno de 50 e 67.5%, respectivamente, após irradiação. A fotodegradação mostrou que as nanopartículas poliméricas demonstraram fotodegradação superior a 40% após a dose 15 J/cm². Estes resultados corroboraram com estudo anterior¹⁰⁷, em que a curcumina não conjugada ao Pluronic® F-127 teve menor fotodegradação em comparação com a curcumina em nanopartículas. Os resultados observados são semelhantes a outros dois estudos^{24,123}, onde um demonstrou a degradação da curcumina de 50%, porém utilizando dose de 9,4 J/cm². No outro estudo a degradação na ordem de 70% após dose de 0,4 J/cm². Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes concentrações e doses de luz nos diferentes estudos²⁴.

A inativação fotodinâmica é capaz de induzir a morte celular e promover a redução dos níveis de bactérias, fornecendo assim meios adicionais de prevenção da cárie dentária que é causada principalmente pela presença de *Streptococcus mutans*^{40,41}. Araújo et al ⁴⁰ avaliou a suscetibilidade de culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* à inativação fotodinâmica após sensibilização à curcumina, no qual duas concentrações diferentes de curcumina foram testadas

(0,75 e 1,5 g/L) associadas a diodo de emissão de luz com dose de 5,7 J/cm². Os nossos resultados foram diferentes desse estudo⁴⁰, possivelmente devido à alta concentração usada do fotossensibilizador para sensibilização das culturas planctônicas e a baixa dose de luz. Esse estudo⁴⁰ obteve reduções significativas na viabilidade de *Streptococcus mutans* (99.99%) quando se utilizou-se o fotossensibilizador na concentração de 1,5 g/L. Contudo os dados⁴⁰ de toxicidade não apresentaram nenhuma redução significativa.

Um estudo¹²⁴ que avaliou o potencial fotodinâmico da curcumina e LED azul sobre *Streptococcus mutans* em cultura planctônica mostrou a inativação pela curcumina livre associada à LED de luz azul em 3 diferentes concentrações: 2000; 4000 e 8000 µM e em 3 diferentes doses: 24, 48 e 72 J/cm². Os resultados¹²⁴ mostraram redução bacteriana de 60% em suspensão planctônica na concentração de 4000 µM de curcumina associada a 48 e 72 J/cm². Já em outro trabalho⁴⁵ avaliou-se diferentes LEDs e diferentes tempos de exposição para ativar diferentes concentrações de curcumina em suspensões planctônicas de *Streptococcus mutans* obtendo fotoinativação efetiva nessas suspensões em tempos de iluminação ultracurtos⁴⁵ (menos de 1 minuto). Dados semelhantes foram mostrados em outros estudos⁴²⁻⁴⁴ utilizando o mesmo fotossensibilizador em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans*.

A exposição ao oxigênio tem um profundo efeito nas propriedades fenotípicas do *Streptococcus mutans*, que influencia a virulência dessa bactéria⁵². Outro estudo⁴¹ de Araújo et al. avaliou a suscetibilidade de multiespécies de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* à inativação fotodinâmica na fase de biofilme e em lesões de cárie dentinária. Esse estudo utilizou diferentes concentrações (0,75, 1,5, 3,0, 4,0 e 5,0 g/L) de curcumina sendo a concentração menor de curcumina (0,75 g/L) suficiente para matar 97,5% dos microrganismos. Os nossos dados foram semelhantes a esse estudo, mesmo a concentração do nosso fotossensibilizador sendo mais baixa e aplicada em biofilme *single* espécie, além disso nosso estudo não encontrou nenhuma redução significativa para a curcumina na ausência de luz azul sendo semelhante ao estudo⁴¹ de Araújo et al. Dados semelhantes foram mostrados em outros estudos⁷⁵⁻⁷⁷ utilizando diferentes fotossensibilizadores em biofilme de *Streptococcus mutans*.

Os efeitos de diferentes concentrações da curcumina e tempos de incubação 5 e 10 min prévios à irradiação em biofilme de *Streptococcus mutans* foram

estudados⁴³. A curcumina ativada pela luz nas concentrações de 40-60µM apenas suprimiram a viabilidade dos biofilmes em 50%, e o tempo de incubação não teve efeito significativo na eficiência antimicrobiana⁴³. Em nosso estudo apenas a concentração de 270 µM de curcumina não conjugada teve efeito em sobre a bactéria na forma planctônica em MIC e MIB e em biofilme, já a curcumina conjugada a micelas de Pluronic® F-127 teve efeito significativo apenas no biofilme. A suscetibilidade do biofilme à curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 deve estar associada ao arranjo da cultura planctônica ser diferente do biofilme, ou ao processo de incorporação visto que a curcumina precisa sair de dentro das micelas de Pluronic® F-127 e se ligar as células do biofilme e cultura planctônica.

A inativação fotodinâmica de patógenos cariogênicos usando curcumina como fotossensibilizador tem um efeito tóxico nos micro-organismos durante a fotoativação desde que se tenha uma concentração mínima que seja capaz de inativar o patógeno¹¹⁹. No entanto, é necessário usar concentrações maiores do fotossensibilizador para um procedimento bem sucedido¹¹⁹. A curcumina tem sido bastante utilizada atualmente como fotossensibilizador na inativação fotodinâmica contra micro-organismos, no entanto a falta de solubilidade em água, instabilidade e escassa biodisponibilidade dificultam sua aplicação in vivo¹⁰⁷. Um estudo¹⁰⁷ avaliou também a síntese da curcumina em nanopartículas poliméricas e seu efeito fotodinâmico em culturas planctônicas e de biofilmes¹⁰⁷. Esse estudo¹⁰⁷ mostrou que a curcumina quando encapsulada altera as propriedades físico-químicas ao longo do tempo como relatadas no nosso estudo, e a fotodegradação se assemelha à curcumina não encapsulada. Contudo, no nosso estudo as formulações sintetizadas melhoraram a solubilidade da curcumina em água, e a curcumina conjugada em nanopartículas reduziu a citotoxicidade do DMSO 10% quando utilizado na curcumina não conjugada, mostrando que esses dados são condizentes com os dados de outro estudo¹⁰⁷.

Uma combinação de uma nova luz visível de amplo espectro não coerente no curto tempo de exposição com baixas concentrações dos fotossensibilizadores (curcumina e azul de toluidina) alcançou uma fotoinativação letal para o *Streptococcus mutans*, e pode-se ser considerada uma abordagem antimicrobiana eficaz in vitro para reduzir o número de micro-organismos envolvidos com a cárie dentária¹¹⁷. Estudos^{116,118} envolvendo diferentes fotossensibilizadores e biofilmes multiespecíficos de *Streptococcus mutans* se mostraram com efeitos eficazes na

inativação fotodinâmica contra esses biofilmes orais compostos sugerindo sua potencial aplicação clínica. O estudo¹¹⁸ que avaliou o potencial da curcumina inativação fotodinâmica em biofilmes multiespécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, e *Streptococcus mutans* de diferentes idades (24 e 48 h) pode-se concluir que ambos os biofilmes foram suscetíveis a curcumina na inativação fotodinâmica.

Um estudo¹⁰⁷ recente mostrou a inativação de culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* em curcumina associada à luz azul após 40 minutos de pré-irradiação e uma dose de $43,2 \text{ J/cm}^2$. A dose de luz utilizada nessa pesquisa foi semelhante à outra¹²⁴, que utilizou 42 J/cm^2 para curcumina a $0,75 \text{ M}$, e foi observada uma redução de $5,37 \log_{10}$ na cultura planctônica de *Streptococcus mutans*. Um outro estudo mostrou que 15 mg/mL de curcumina e uma dose de luz de $5,7 \text{ J/cm}^2$ resultou na inativação de *Streptococcus mutans*⁴⁰.

A concentração de $130 \mu\text{M}$ de curcumina em nanopartículas e de curcumina foram utilizados para a avaliação antimicrobiana de culturas planctônicas¹⁰⁷. A concentração inibitória mínima menor encontrada em estudos anteriores¹²⁹, poderia explicar a redução $0,75 \log_{10}$ para *Streptococcus mutans* quando tratados apenas com curcumina sem luz¹⁰⁷. Os valores de CIM de $0,128 \text{ mg/mL}$ ¹¹⁰ foram relatados contra *Streptococcus mutans*. Os valores de CIM de 6 mg/mL também foi encontrada para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, mas nenhum efeito bactericida (ausência de crescimento de colônias) foi observado¹⁴².

Panhóca et al.³⁹ realizaram a inativação fotodinâmica com LED azul e curcumina associada a tensoativo (dodecil sulfato de sódio a $0,1\%$), e mostraram inativação de *Streptococcus mutans* em biofilme na inativação fotodinâmica. Na mesma linha, Paschoal et al.¹²⁴ mostraram que uma baixa concentração de curcumina associada à luz branca (400-700 nm com um comprimento de onda central de 550 nm) leva à inativação de *Streptococcus mutans*.

As imagens obtidas em microscopia confocal a laser comprovaram os resultados obtidos para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). As imagens da Figura 33 correspondem aos grupos FSD+L+ (A), FSM+L+ (B), M+L+ (C), FS-L+ (D) e D+L+ (E), respectivamente, em aumento de 20x, os quais foram irradiados por luz em comprimento de onda azul. No grupo tratado com curcumina conjugada ao Pluronic® F-127, observou-se maior intensidade de fluorescência no vermelho, o que condiz com maior quantidade de células bacterianas mortas, sendo

marcadas pelo uso do corante BacLight® LIVE/DEAD, o qual faz a utilização de dois compostos diferentes (corantes de ácidos nucleicos), o iodeto de propídio e o Syto 9. O iodeto de propídio cora as células bacterianas mortas de vermelho, pois penetra apenas nas células bacterianas que tiveram dano na sua membrana. Já o Syto 9 cora as células bacterianas viáveis em verde, pois penetra nas células, porém sem haver dano na membrana ocasionado pelos diferentes tratamentos, o que condiz com a presença de células bacterianas viáveis.

As imagens da Figura 34, correspondem aos grupos FSD+L+ (A), FSM+L+ (B), M+L+ (C), FS-L+ (D) e D+L+ (E) respectivamente, em aumento de 63x, o que permite observar de forma mais adequada as colônias de *Streptococcus mutans* que formam o biofilme induzido por 7 dias, uma vez que esta bactéria possui tamanho bastante reduzido, sendo da ordem de 0.5 a 2 micrometros em diâmetro.

Por outro lado, as imagens da Figura 35 correspondem aos grupos para a citotoxicidade no escuro, bem como os controles positivo (CP) e negativo (CN). As letras A, B, C, D, E, e F correspondem aos grupos FSD+L-, FSM+L-, M+L-, FS-L-, D+L- e C+L- respectivamente, em aumento de 20x, os quais não foram irradiados por luz em comprimento de onda azul. Com exceção do grupo controle positivo, o qual foi tratado com solução de clorexidina a 0.2%, as demais imagens representam as situações em que as células emitiram maior intensidade de fluorescência verde, demonstrando viabilidade bacteriana para os grupos aonde não foi realizada a irradiação, ou seja, a inativação fotodinâmica, além do controle negativo.

A Figura 35-F apresenta a imagem em aumento de 20x do grupo controle positivo (CP), do biofilme de *Streptococcus mutans*, induzido por 7 dias. Para o grupo CP, observam-se que quase todas as células permaneceram vermelhas, indicando que o biofilme após o tratamento com clorexidina a 0.2% estava inviável. Quando avaliados os grupos tratados com curcumina conjugada ou não ao Pluronic® F-127, na ausência de luz (citotoxicidade no escuro), observou-se que a maioria das células estavam coradas em verde, indicando, portanto, que apenas o uso do fotossensibilizador curcumina conjugado ou não às micelas não promoveu a morte do biofilme de *Streptococcus mutans* sem irradiação (Figura 35-A-B). Essa observação confirma a ausência de citotoxicidade da curcumina conjugada ou não ao Pluronic® F-127. Esses achados também confirmam os dados obtidos para as unidades formadoras de colônia (UFC/mL), os quais não apresentaram diferença estatística significativa do grupo controle negativo ($p>0.05$).

Nos grupos aonde realizou-se a inativação fotodinâmica, observou-se maior número de células coradas em vermelho apenas para o grupo da curcumina conjugada ao Pluroni® F-127, indicando que neste grupo a inativação fotodinâmica foi eficiente em danificar a membrana das bactérias e assim levar a morte do biofilme de *Streptococcus mutans* (Figura 33-B), demonstrando inclusive melhores resultados quando comparado ao grupo no qual curcumina em DMSO foi utilizada. Esses achados confirmam os resultados obtidos para UFC/mL, onde observou-se 4 logs de redução do biofilme de *Streptococcus mutans* após a inativação fotodinâmica para a curcumina conjugada ao Pluronic® F-127.

Para os grupos contendo apenas micelas, água Milli-Q e DMSO irradiados pela luz azul, observamos a predominância da fluorescência verde do corante SYTO 9 indicando um grande número de células bacterianas viáveis (Figura 33-C, D e E, respectivamente).

O grupo controle negativo (CN) permaneceu altamente viável (coloração verde) após os 7 dias de indução do biofilme como pôde-se verificar na imagem da Figura 35-D em aumento de 20x e na Figura 36-D em aumento de 63x, respectivamente.

Dessa forma, com base nos resultados obtidos neste trabalho, a curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 pode ser uma alternativa na eliminação ou controle do biofilme *single* espécie de *Streptococcus mutans* durante o tratamento da cárie dentária, entretanto ainda são necessários mais estudos *in vitro* em biofilmes multiespécie, uma vez que a doença cárie é causada por vários tipos de bactérias, embora o *Streptococcus mutans* seja o principal fator etiológico bacteriano. Adicionalmente, estudos de citotoxicidade em diferentes culturas de células são necessários para na sequência avaliarmos o seu uso em animais e em humanos, assim como estudos que possam aumentar a duração do tempo de estabilidade da formulação, sejam igualmente importantes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que o tratamento com a inativação fotodinâmica utilizando a curcumina conjugada ao Pluronic® F-127 na concentração de 0,5% combinado a luz LED e dose de 15J/cm², diminuiu a viabilidade do biofilme de *Streptococcus mutans*. Além disso, nenhuma atividade antibacteriana foi encontrada na ausência de luz.

REFERÊNCIAS*

1. Rouabhia M, Chmielewski W. Diseases Associated with Oral Polymicrobial Biofilms. *Open Mycol J.* 2012; 6: 27–32.
2. Zero DT, Fontana M, Martínez-Mier EA et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140 Suppl: 25S-34S.
3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB, et al. Dental caries. *Lancet (London, England).* 2007; 369(9555): 51–9.
4. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010; 192(19): 5002–17.
5. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005; 13(12): 589–95.
6. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44(3): 272–6.
7. Baker JL, Edlund A. Exploiting the Oral Microbiome to Prevent Tooth Decay: Has Evolution Already Provided the Best Tools? *Front Microbiol.* 2018; 9: 3323.
8. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(2): 114–122.
9. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1): 34–40.
10. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, et al. Overall-Mouth Disinfection by Photodynamic Therapy Using Curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30: (2)96–101.
11. Santezi C, Tanomaru JMG, Bagnato VS, et al. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 15: 46–52.
12. Summers AN, Larson DL, Edmiston CE, et al. Efficacy of preoperative decontamination of the oral cavity. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106(4): 895–900.
13. Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, et al. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. *J Oral Investig.* 2015; 3(1): 33.

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

14. Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, et al. Mupirocin and chlorhexidine resistance in *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 559–68.
15. Neto CS. Eficácia da inativação fotodinâmica mediada pela curcumina sobre biofilme e efeito nas propriedades de materiais restauradores resinosos e esmalte dental. [tese na internet]. Araraquara: Faculdade de Odontologia, Unesp [acesso 7 jun. 2017]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/144333?show=full>.
16. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2013; 48(6): 696–705.
17. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 445–51.
18. Ribeiro APD, Pavarina AC, Dovigo LN, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(2): 391–8.
19. Inada NM, da Costa MM, Guimarães OCC, et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012; 9(1): 60–8.
20. Andrade MC, Ribeiro APD, Dovigo LN, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(2): 200–10.
21. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(6): 2000–6.
22. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013; 51(3): 243–51.
23. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927–34.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895–903.
25. Akbar MU, Zia KM, Nazir A, et al. Pluronic-Based Mixed Polymeric Micelles Enhance the Therapeutic Potential of Curcumin. *AAPS PharmSciTech*. 2018; 19(6): 2719–39.

26. Incio JL. Funcionalização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com fármacos hidrofóbicos e construção de um sistema para controle de liberação.[tese na internet]. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica, PUC (acesso 14 Maio. 2017). http://www.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/1213327_2014_completo.pdf
27. Brito DHA, Silva RF, Oliveira CP, et al. Influência do polietilenoglicol (PEG400, PEG 6K E PEG 35K) na solubilização da mangiferina em soluções aquosas de Pluronic F127®. In: Anais do 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB; 22 a 25 de agosto; Natal/RN [acesso 19 jun. 2017] Disponível em: http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:Nu38bPR1FOkJ:scholar.google.com/&hl=pt-BR&as_sdt=0,5.
28. Solov'eva AB, Melik-Nubarov NS, Aksenova NA, et al. Porphyrin photosensitizers solubilized with pluronics in the oxidation of tryptophan. *Russ J Phys Chem*. 2006; 80(1): 124–30.
29. Zhientaev TM, Melik-Nubarov NS, Litmanovich EA, et al. The effect of Pluronic on the photocatalytic activity of water-soluble porphyrins. *Polym Sci Ser A*. 2009; 51(5): 502–11.
30. Malmsten M. *Polymer Solutions and Gels. Surfactants and Polymers in Drug Delivery (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2002.
31. Riess G. Micellization of block copolymers. *Prog Polym Sci*. 2003; 28(7): 1107–70.
32. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter B V, et al. Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2010; 1: 149–73.
33. Kadam Y, Yerramilli U, Bahadur A, et al. Micelles from PEO–PPO–PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011; 83(1): 49–57.
34. Sahu A, Kasoju N, Goswami P, et al. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. *J Biomater Appl*. 2011; 25(6): 619–39.
35. Terra Garcia M, Correia Pereira AH, Jorge AOC, et al. Photodynamic Therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 24: 256-61.
36. Lynch DJ, Michalek SM, Zhu M, et al. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein deletion mutants. *Oral Health Dent Manag*. 2013; 12(4): 191–9.

37. Abranches J, Miller JH, Martinez AR, et al. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*. 2011; 79(6): 2277–84.
38. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(10): 1343–48.
39. Panhoca V, Geralde M, Corrêa T, et al. Enhancement of the Photodynamic Therapy Effect on *Streptococcus Mutans* Biofilm. *Journal of Physical Science and Application*. 2014; 4 (2):107-114
40. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, et al. Photodynamic Effects of Curcumin Against Cariogenic Pathogens. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30(7): 393–399.
41. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, et al. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(2): 629–635.
42. Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(1): 1–6.
43. Manoil D, Filieri A, Gameiro C, et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11(3): 372–379.
44. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal M, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol*. 2015; 15(1): 187.
45. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(2): 885–90.
46. Gholibegloo E, Karbasi A, Pourhajibagher M, et al. Carnosine-graphene oxide conjugates decorated with hydroxyapatite as promising nanocarrier for ICG loading with enhanced antibacterial effects in photodynamic therapy against *Streptococcus mutans*. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2018; 181: 14–22.
47. Aytac Bal F, Ozkocak I, Cadirci BH, et al. Effects of photodynamic therapy with indocyanine green on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 26: 229–34.
48. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014: 824538.
49. Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, et al. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *Open access Maced J Med Sci*. 2018; 6(7): 1289–95.

50. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, et al. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 10.
51. Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, et al. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 20: 234–7.
52. Ahn S-J, Ahn S-J, Browngardt CM, et al. Changes in biochemical and phenotypic properties of Streptococcus mutans during growth with aeration. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(8): 2517–27.
53. Kim D, Liu Y, Benhamou RI, et al. Bacterial-derived exopolysaccharides enhance antifungal drug tolerance in a cross-kingdom oral biofilm. *ISME J.* 2018; 12(6): 1427–42.
54. Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, et al. Streptococcus mutans competence-stimulating peptide inhibits Candida albicans hypha formation. *Eukaryot Cell.* 2009; 8(1): 1658–64.
55. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, et al. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): 1–5.
56. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82(5): 1968–81.
57. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of Streptococcus sanguis and other streptococci with Candida albicans. *Infect Immun.* 1990; 58(5): 1429–36.
58. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001; 74(5): 656–69.
59. Machado AE da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000; 23(2): 237–43.
60. MELO, W.C.M.A.; PERUSSI, J.R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada.* 2012; 33(3): 331– 40.
61. Skivka LM, Gorobets OB, Kutsenok V V, et al. 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy of Lewis lung carcinoma: a role of tumor infiltration with different cells of immune system. *Exp Oncol.* 2004; 26(4): 312–5.
62. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J Med Chem.* 2004; 47(16): 3897–915.

63. Mello R, Martínez-Ferrer J, Alcalde-Aragonés A, et al. Reactions at Interfaces: Oxygenation of *n*-Butyl Ligands Anchored on Silica Surfaces with Methyl(trifluoromethyl)dioxirane. *J Org Chem*. 2011; 76(24): 10129–39.
64. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova*. 2007; 30(4): 988–94.
65. Zhu TC, Finlay JC. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Med Phys*. 2008; 35(7): 3127–36.
66. Longo JPF, Lozzi SP, Azevedo RB. Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment. *Rev Gaúcha Odontol*. 2011; 59: 51-57.
67. Zhu Z, Tang Z, Phillips JA, et al. Regulation of Singlet Oxygen Generation Using Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc*. 2008; 130(33): 10856–7.
68. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2329–35.
69. Harris F, Pierpoint L. Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial Agent. *Med Res Rev*. 2012; 32(6): 1292–327.
70. Jori G, Fabris C, Soncin M, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(5): 468–81.
71. Brovko L. Photodynamic Treatment: A New Efficient Alternative for Surface Sanitation. *Adv Food Nutr Res*. 2010; 61: 119-47.
72. Hulscher ME, Grol RP, van der Meer JW. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(3): 167–75.
73. Herrmann M, Gaudet G. The economic dynamics of antibiotic efficacy under open access. *J Environ Econ Manage*. 2009; 57(3): 334–50.
74. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, et al. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers Surg Med*. 2010; 42(1): 38–44.
75. Wood S, Metcalf D, Devine D, et al. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(4): 680–4.
76. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(2): 324–30.

77. Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, et al. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(1): 64–9.
78. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009; 6(3-4): 170–88.
79. Ferro S, Ricchelli F, Monti D, et al. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a polycationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(5): 1026–34.
80. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7(2): 98–105.
81. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-50.
82. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2005; 78(1): 1–6.
83. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 294(2): 133–40.
84. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, et al. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2009; 95(2): 71–80.
85. Mahmoudi H, Bahador A, Pourhajibagher M, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *J Lasers Med Sci.* 2018; 9(3): 154–60.
86. Pérez-Laguna V, Gilaberte Y, Millán-Lou MI, et al. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review. *Photochem Photobiol Sci.* 2019; 18 (5): 1020-9.
87. Pellissari CVG, Pavarina AC, Bagnato VS, et al. Cytotoxicity of antimicrobial photodynamic inactivation on epithelial cells when co-cultured with *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2016; 15(5): 682–90.
88. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 2008; 53(9): 61–109.
89. Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 403-5.
90. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy. 2001; 57 (47): 9513-47.

91. Bonnett R, Djelal BD, Hamilton PA, et al. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin(m-THPBC). A comparative study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999; 53(1-3): 136–43.
92. Rotomskis R, Bagdonas S, Streckyte G, et al. Phototransformation of Sensitisers: 3. Implications for Clinical Dosimetry. *Lasers in Medical Science.* 1998; 13 (4): 271-8.
93. Rotomskis R, Streckyte G, Bagdonas S. Phototransformations of sensitizers 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1997; 39(2): 167–71.
94. Hadjur C, Lange N, Rebstein J, et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1998; 45(2-3): 170–8.
95. Karges J, Heinemann F, Maschietto F, et al. A Ru(II) polypyridyl complex bearing aldehyde functions as a versatile synthetic precursor for long-wavelength absorbing photodynamic therapy photosensitizers. *Bioorg Med Chem.* 2019; 27 (12): 2666-75.
96. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, et al. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(1): 27–42.
97. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic Therapy. *Dermatol Clin.* 2014; 32(3): 415–25.
98. Sharman, Allen, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999; 4(4): 507–17.
99. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 37(3-4): 223–30.
100. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules.* 2011; 16(6): 4567–98.
101. Rohman A. Mini Review Analysis of curcuminoids in food and pharmaceutical products. *International Food Research Journal.* 2012; 19(1): 19-27.
102. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch Gerontol Geriatr.* 2002; 34(1): 37–46.
103. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4(7): 523-30.

104. Anitha A, Maya S, Deepa N, et al. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. *Carbohydr Polym.* 2011; 83(2): 452–61.
105. Sun W, Zou Y, Guo Y, et al. Construction and characterization of curcumin nanoparticles system. *J Nanoparticle Res.* 2014; 16(3): 2317-9.
106. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol.* 2015; 83: 111–24.
107. Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One.* 2017; 12(11): e0187418.
108. Sakima V, Barbugli P, Cerri P, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules.* 2018; 23(8): 75.
109. Bernd A. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. *Phytochem Rev.* 2014; 13(1): 183–9.
110. Song J, Choi B, Jin E-J, et al. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(7): 1347–52.
111. Lee H-J, Kang S-M, Jeong S-H, et al. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and *Curcuma xanthorrhiza* extract against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 20: 116–9.
112. Panhóca VH, Florez F, Batista de Faria N, et al. Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy against *Streptococcus mutans* Biofilm in situ. *J Contemp Dent Pract.* 2016; 17(3): 184–91.
113. Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, José Dionisio E, et al. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 24: 102–108.
114. Merigo E, Conti S, Ciociola T, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Protocols on *Streptococcus mutans* with Different Combinations of Wavelengths and Photosensitizing Dyes. *Bioengineering.* 2019; 6: 42.
115. Sanches CVG, Sardi J de CO, Terada RSS, et al. Diacetylcurcumin: a new photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy in *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2019; 35(3):340–9.
116. Gong J, Park H, Lee J, et al. Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans* , *Lactobacillus casei* , and *Candida albicans*. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 2019; 37(5): 282–7.

117. Paschoal MA, Santos-Pinto L, Lin M, et al. Streptococcus Mutans Photoinactivation by Combination of Short Exposure of a Broad-Spectrum Visible Light and Low Concentrations of Photosensitizers. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(3): 175-80.
118. Quishida CCC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, et al. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 997–1009.
119. Araújo NC, de Menezes RF, Carneiro VSM, et al. Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35(5): 259–63.
120. Leite DPV, Paolillo FR, Parmesano TN, et al. 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.
121. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, et al. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *Int Endod J.* 2019; 52 (7): 1010-19.
122. Baltazar LM, Krausz AE, Souza ACO, et al. Trichophyton rubrum is Inhibited by Free and Nanoparticle Encapsulated Curcumin by Induction of Nitrosative Stress after Photodynamic Activation. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120179.
123. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, et al. Photoinactivation of Staphylococcus epidermidis biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin – Effect of selected nanocarrier. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47(1): 65–74.
124. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against Streptococcus mutans in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10(3): 313–9.
125. Ahmed T, Gilani A-H. Therapeutic Potential of Turmeric in Alzheimer's Disease: Curcumin or Curcuminoids? *Phyther Res.* 2014; 28(4): 517–25.
126. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003; 23(1): 363–98.
127. Somparn P, Phisalaphong C, Nakornchai S, et al. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(1): 74–8.
128. Tajbakhsh S, Mohammadi K, Deilami I, et al. Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. *African J Biotechnol.* 2008; 7 (21): 3832-35.
129. Martins CVB, da Silva DL, Neres ATM, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 63(2): 337–9.

130. Tsai Y-M, Chien C-F, Lin L-C, et al. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *Int J Pharm.* 2011; 416(1): 331–8.
131. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, et al. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials.* 2014; 35(10): 3365–83.
132. Ji J-L, Huang X-F, Zhu H-L. Curcumin and its formulations: potential anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12(3): 210–8.
133. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, et al. Evaluation of Novel Alginate Foams as Drug Delivery Systems in Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) of Infected Wounds—An In Vitro Study: Studies on Curcumin and Curcuminoides XL. *J Pharm Sci.* 2010; 99(8): 3499–513.
134. Cherreddy KK, Coco R, Memvanga PB, et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J Control Release.* 2013; 171(2): 208–15.
135. Weissig V, Pettinger T, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 4357-73.
136. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010; 75(1): 1–18.
137. Sakata S, Uchida K, Kaetsu I, et al. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiat Phys Chem.* 2007; 76(4): 733–7.
138. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J Saudi Chem Soc.* 2014; 18(2): 85–99.
139. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2007; 3(1): 20–31.
140. Drbohlavova J, Chomoucka J, Adam V, et al. Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. *Curr Drug Metab.* 2013; 14(5): 547–64.
141. Thorley AJ, Tetley TD. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther.* 2013; 140(2): 176–85.
142. Khalil NM, Nascimento TCF do, Casa DM, et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013; 101: 353–60.
143. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine.* 2015; 11(1): 195–206.

144. Marcato PD, Durán N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008; 8(5): 2216–29.
145. Konan YN, Berton M, Gurny R, et al. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18(3-4): 241–9.
146. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. 2009; 85(5): 1053–74.
147. Carrasquillo KG, Stanley AM, Aponte-Carro JC, et al. Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. *J Control Release*. 2001; 76(3): 199–208.
148. Dunne M, Bibby DC, Jones JC, et al. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *J Control Release*. 2003; 92(1-2): 209–19.
149. Tao SL, Desai TA. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(3): 315–28.
150. Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol*. 2007; 18(1): 26–30.
151. Jain KK. Nanomedicine: Application of Nanobiotechnology in Medical Practice. *Med Princ Pract*. 2008; 17(2): 89–101.
152. He C, Hu Y, Yin L, et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31(13): 3657–66.
153. Ghalandarlaki N, Alizadeh AM, Ashkani-Esfahani S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. *Biomed Res Int*. 2014; 1: 1-23.
154. Howard B, Gao Z, Lee S-W, et al. Ultrasound-Enhanced Chemotherapy of Drug-Resistant Breast Cancer Tumors by Micellar-Encapsulated Paclitaxel. *Am J Drug Deliv*. 2006; 4(2): 97–104.
155. Müller RH. Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting : modification, characterization, and in vivo distribution. 1st Edition. Germany (Stuttgart): CRC Press; 1991.
156. Grallert SRM, Rangel-Yagui C de O, Pasqualoto KFM, et al. Polymeric micelles and molecular modeling applied to the development of radiopharmaceuticals. *Brazilian J Pharm Sci*. 2012; 48(1): 1–16.
157. Oerlemans C, Bult W, Bos M, et al. Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharm Res* 2010; 27(12): 2569–89.

158. Israelachvili JN. Intermolecular and Surface Forces. 3rd Edition. Amsterdam (The Netherlands): Academic Press; 2011.
159. Blankschtein D, Thurston GM, Benedek GB. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. *J Chem Phys.* 1986; 85(12): 7268–88.
160. Batrakova E V., Kabanov A V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release.* 2008; 130(2): 98–106.
161. Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 66(3): 303–17.
162. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(8): 2950–62.
163. Oses JKV. Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)[tese na internet]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP [acesso 20 jun. 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-21122016-104745/pt-br.php>
164. Lira ACS. Avaliação De Diferentes Técnicas De Dispersão Para Polimerização Em Miniemulsão[tese na internet]. Florianópolis: Universidade de Santa Catarina [acesso 20 Mar. 2018]. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/174123/344685.pdf?sequence=1>
165. Hiemenz P, Rajagopalan R. Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded. 3rd Edition. United States of America (New York): CRC Press; 1997.
166. Berne BJ and P. Dynamic Light Scattering. 2nd Edition. United States of America (New York): Plenum Press; 1976.
167. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50(1): 161–77.
168. Silva VLD. Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos, Contendo Paclitaxel, para Terapêutica de Cancro da Mama. Coimbra: Universidade de Coimbra [acesso 20 mar. 2018].Disponível em: [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/24658/1/Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos_Vera Silva 2013.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/24658/1/Micelas%20Polim%C3%A9ricas%20e%20Nanop%C3%A1rticulas%20de%20L%C3%ADpidos%20S%C3%B3lidos_Vera%20Silva%202013.pdf)
169. Hunter RJ. Zeta potential in colloid science : principles and applications. 1st Edition. London: Academic Press; 1981.
170. MALVERN INSTRUMENTS LTDA. Zetasizer nano: user manual. England: Malvern instruments; 2013.

171. Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, et al. *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. PLoS One. 2016; 11(3): e0150457.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 04 de março de 2019.

Diego Dantas Lopes dos Santos