

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/03/2021.



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.

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.