

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/05/2021.



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



Bárbara Donadon Reina

Inativação fotodinâmica mediada pela Curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ

Araraquara

2019



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



Bárbara Donadon Reina

Inativação fotodinâmica mediada pela Curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ

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

Orientador: Prof^a Dr^a Livia Nordi Dovigo

Araraquara

2019

Reina, Bárbara Donadon

Inativação fotodinâmica mediada pela Curcumina veiculada sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ / Bárbara Donadon Reina. -- Araraquara: [s.n.], 2019
84 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas)
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo

1. Fotoquimioterapia 2. Curcumina 3. Placa Dentária
4. Cristais líquidos I. Título

Bárbara Donadon Reina

Inativação fotodinâmica mediada pela Curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Profª Drª Lívia Nordi Dovigo

Profª Drª Fernanda Brighenti Lourenção

Profª Drª Natalia Mayumi Inada

Araraquara, 08 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Bárbara Donadon Reina

NASCIMENTO: 25 de outubro de 1993 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Ana Lúcia Donadon Reina e Fábio Tadeu Reina

2012-2016 Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista

2012 - 2012 Estágio no Programa de Iniciação Científica voluntária, na Disciplina de Anatomia, no Departamento de Morfologia, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Domingos André Bolini.

2013 - 2013 Estágio no Programa de Iniciação Científica, na Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, no Departamento de Odontologia Social, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Lúvia Nordi Dovigo (240 horas).

Projeto de pesquisa: Confiabilidade de um método para avaliação de produção de fosfolipase em *Candida albicans*.

2013 - 2014 Bolsista de Iniciação Científica do Programa Apoio a Jovens Talentos da UNESP (PROPe 20/2013), na Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, no Departamento de Odontologia Social, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Lúvia Nordi Dovigo.

Projeto de pesquisa: Confiabilidade de um método para avaliação de produção de fosfolipase em *Candida albicans*.

2014 - 2014 Estágio no Programa de Iniciação Científica, na Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, no Departamento de Odontologia Social, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Lúvia Nordi Dovigo (240 horas).

Projeto de pesquisa: Produção de Proteinase em *Candida albicans*: reprodutibilidade intra-examinador do método baseado em placas de Agar

2014 - 2016 Representante Discente no Conselho de Classe da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2014 - 2016	Representante Discente na Comissão Discente de Apoio à Gestão da Faculdade de Odontologia de Araraquara.
2014 - Atual	Estudante do Grupo de Pesquisa: Biomateriais e Biofilmes, junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
2015 - 2015	Bolsista de Iniciação Científica do Programa Apoio a Jovens Talentos da UNESP (PROPe 12/2014), na Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, no Departamento de Odontologia Social, sob orientação da Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo. Projeto de Pesquisa: Microdureza e Rugosidade superficial de Esmalte Dental e Resinas Compostas após desinfecção fotodinâmica mediada por Curcumina.
2015 - 2016	Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC (edital 14/2015 PROPe), na Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, no Departamento de Odontologia Social, sob orientação da Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo. Projeto de pesquisa: Rugosidade superficial de resinas compostas após desinfecção fotodinâmica mediada por Curcumina em quitosana.
2017 - 2017	Estagiária de Docência na Disciplina de Estatística e Probabilidade, no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, supervisionada pela Profª Drª Lívia Nordi Dovigo, durante o segundo semestre de 2018 (60 horas).
2017 - 2019	Bolsista de mestrado (FAPESP 2016/24918-5), com o projeto “Inativação fotodinâmica mediada pela curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ”.
2017 - 2018	Membro discente (suplente) do Conselho de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara.
2018 - 2018	Estagiária de Docência na disciplina de Bioestatística, no curso de Odontologia, supervisionada pela Profª Drª Lívia Nordi Dovigo, durante o primeiro semestre de 2018 (45 horas).

Dedico este trabalho aos meus avós Agenor e Doraci, aos meus pais Fábio e Ana Lúcia e à minha irmã Júlia.

AGRADECIMENTOS

Gratidão primeiramente e sempre a Deus, meu Pai, a Jesus meu mestre e à Maria de Nazaré, minha Mãe que são as fontes inesgotáveis de amor que sustentam minha vida e guiam minhas ações e propósitos.

Gratidão ao Universo por ter trazido até mim tantas oportunidades e pessoas maravilhosas à minha vida e por todos os sinais que tem me enviado de que estou no caminho certo e do quanto é maravilhoso viver.

Gratidão aos meus pais, Ana Lúcia e Fábio, por serem a minha base e exemplos de perseverança e coragem, por todo apoio em todas as minhas decisões profissionais e amparo nas minhas dificuldades. Agradeço por todo esforço, que muitas vezes nem podiam fazer, mas que faziam para que eu e minha irmã pudéssemos conquistar nossos objetivos.

Gratidão aos meus amores Bernard (que está no céu), Caco e Zequinha por serem os melhores companheiros e por me darem a honra de receber o amor incondicional que só um animalzinho sabe dar.

Gratidão à minha irmã Júlia, minha xuli, que mesmo longe sempre está presente no meu coração e pensamentos, por todo apoio e por todo colo à distância.

Gratidão aos meus avós Agenor e Doraci, por serem meus exemplos de amor incondicional, por ser sempre se entusiasmarem com tudo que faço e por sempre ser a “princesa Barbarela da vó”.

Gratidão também ao meu padrinho Ronaldo, por nunca ter negado ajuda ou suporte a qualquer coisa que eu decidisse fazer.

Gratidão ao meu namorado Lorrán, por ter me salvado de mim inúmeras vezes, por me apoiar incondicionalmente e por ser o maior companheiro que alguém poderia imaginar! Agradeço por estar sempre à disposição, sem medir esforços para qualquer coisa que eu precise, sempre com muito amor!

Gratidão à minha melhor amiga Aline Leite de Farias, por ser minha dupla a graduação inteira e continuar sendo minha dupla na vida e na pós-graduação. Por toda ajuda, apoio e paciência que sempre teve comigo. Sem você, eu não teria alcançado muita coisa!

Gratidão à minha irmã de outra mãe, Ana Laura, por todo apoio externo e ânimo que me deu em todos esses anos da minha vida! Você é meu exemplo de coragem e força de vontade!

Gratidão à minha orientadora Lívia, por ser um ser de luz na minha vida e meu exemplo de professora, eu desejo um dia ter a metade da didática que você tem! Sou eternamente grata pela oportunidade que me deu lá em 2012, de ser sua aluna de iniciação científica, por ser sua aluna de pós-graduação, por todo apoio diário que me dá, tanto como professora quanto como amiga! Gratidão também por ter me incentivado na carreira acadêmica e me proporcionado a descoberta da minha vocação! Gratidão tudo que já fez por mim e por todo amor com o qual sempre me tratou e trata todos à sua volta!

Gratidão à professora Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, por ser luz na minha vida! Por me salvar tantas vezes que até perdi a conta! Por sempre ter me tratado com amor e me dado colo, literalmente, quando tudo parecia que ia desmoronar. Gratidão por ter reforçado na minha vida o mundo espiritual, por ter mostrado que eu tenho um propósito na vida, por ter me apresentado o lugar que me traz paz genuína e por me mostrar que o amor é a única e melhor saída!

Gratidão à minha psicóloga e amiga amada Rita, por ter me salvado em um momento difícil da minha vida, por todos os puxões de orelha necessários, por todo atendimento amoroso, por todo apoio que sempre me deu, por ser extremamente solícita e preocupada e por se mostrar sempre disponível a me ajudar! Você mora no meu coração!

Gratidão aos meus queridos Leiris, Júnior e Lorenzo, por terem me acolhido tão bem na casa e família de vocês e por fazerem parte agora da minha família!

Gratidão aos meus amigos Morango, Fiel, Sky, Intriga, Barbara, Maria Carolina, Durole e Bruna por todo apoio, amizade e preocupação que sempre tiveram comigo, estando sempre dispostos a ser meu colo quando precisei e por todos os momentos alegres e tristes que já vivemos juntos. A amizade de vocês é muito importante para mim!

Gratidão aos meus amados Quele (minha segunda mami), Bianca (amiga de anos, que reencontrei) e Júnior por serem minha segunda família e por todo amor com que me acolheram, desde o primeiro dia que entrei no espaço de vocês!

Gratidão à Bateria Cavernosa, por ter feito parte da minha vida até o começo desse ano, desde a graduação, sendo a melhor parte da faculdade para mim, por me acolher e permitir que eu fizesse parte dessa família! Gratidão por aliviar meus momentos de stress, por me ensinar o amor ao tamborim e o trabalho em equipe!

Sinto falta e guardo cada um de vocês e cada apresentação nossa no meu coração, com muito amor! Pra sempre Cavernosa!

Gratidão à Bruna Novelli, por todo apoio que me deu em minha pesquisa e por ter se tornado uma amiga tão querida, sempre amorosa e disposta a ajudar a todos! Gratidão por ser um ser de luz na minha vida!

Gratidão ao Samuel que além de ser um aluno de iniciação científica exemplar e dedicado, é um amigo muito querido e maravilhoso! Gratidão por me ajudar na pesquisa e pela sua amizade!

Gratidão às lindas Paulinha e Isa, por serem muito mais que somente alunas de iniciação científica, mas serem amigas queridas, divertidas e sempre dispostas a me ajudar!

Gratidão à Paula Barbugli por toda ajuda laboratorial e por compartilhar seus conhecimentos comigo!

Gratidão à Bruna Pimentel, por ter sido extremamente solícita quando precisei, por não ter medido esforços para me passar seus conhecimentos, deixando de lado seus afazeres para me ajudar!

Gratidão à Geisiane, Luana, Jaqueline, Lígia e Ana Cláudia, por todo apoio na minha pesquisa e por todas as conversas que alegravam sempre meus dias no laboratório!

Gratidão à Tatiane Miranda Manzoli por toda ajuda na minha pesquisa.

Gratidão aos voluntários que aceitaram participar da minha pesquisa, sem a colaboração de vocês não seria possível realizar meu trabalho!

Gratidão ao Professor Doutor Ewerton Garcia de Oliveira Mima, por ter permitido o uso do laboratório, do qual é responsável, para que eu realizasse minha pesquisa.

Gratidão à Professora Renata Renata Garcia Fonseca, por ter permitido o uso do laboratório do qual é responsável para que eu pudesse realizar uma parte de minha pesquisa.

Gratidão ao Otaviano, por fornecer todo o material necessário à minha pesquisa, sempre muito prestativo e preocupado.

Gratidão às meninas lindas Marcinha, Neli, Gláucia e Cris por toda a convivência, conversas, apoio e amizade!

Gratidão ao Alessandro e Moacir pelo auxílio na parte protética da minha pesquisa.

Gratidão ao Departamento de Odontologia Social, pela convivência e uso das dependências.

Gratidão ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pela permissão de uso de suas dependências.

Gratidão à Universidade Estadual Paulista, na figura do Senhor Reitor, Professor Doutor Sandro Roberto Valentini e à Faculdade de Odontologia de Araraquara nas figuras da professora doutora Elaine Maria Sgavioli Massucato e professor doutor Edson Alves Campos, respectivamente diretora e vice-diretor dessa faculdade, por ter me acolhido desde o primeiro ano da graduação e ter sido minha segunda casa e por ser o lugar no qual recebi a formação de cirurgiã-dentista e me viu galgar todo o caminho acadêmico que tanto almejo.

Gratidão à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/24918-5), por ter me concedido bolsa de mestrado, tendo um papel fundamental no financiamento e desenvolvimento da minha pesquisa.

“Um minuto a mais na verdade é um minuto a menos, se vocês soubessem o quanto a vida é passageira, correriam menos e entenderiam o porquê o **‘agora’** se chama **‘presente’**. Agradeça cada amanhecer, sorria mais, se preocupe menos afinal, o que tem solução se solucionará, o que não tem, solucionado está...Seja feliz, como for, com quem for, por favor e por **amor...**”
Marcelo Gugu.

* Gugu M. Linda de morrer. Álbum: Até Que Enfim Gugu; 2013.

Reina BD. Inativação fotodinâmica mediada pela curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido sobre biofilme dental formado in situ [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Estima-se que mais de 60% das infecções humanas são originadas pela presença de biofilmes. A placa dentária é o biofilme mais antigo descrito na literatura e pode ser composta por diferentes gêneros e espécies, com destaque para a atuação de *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* do grupo mutans e *Candida albicans*. A Inativação Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Inactivation* - PDI) vem sendo apontada como modalidade terapêutica promissora para a inativação de microrganismos bucais visando sanar os problemas relacionados com a resistência dos microrganismos e não promover efeitos colaterais adversos. Estudos prévios conduzidos dentro e fora de nosso grupo de pesquisa mostraram que a curcumina possui grande potencial como fotossensibilizador para a PDI. Apesar disso, a curcumina apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas e por isso esse estudo se propôs a avaliar a eficácia antimicrobiana da PDI, utilizando a curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido (SPCL), em biofilmes dentais formados in situ. Esse sistema possui diversas vantagens descritas na literatura, como sua bioadesividade no local de ação, liberação controlada e biocompatibilidade. No entanto, nenhum estudo avaliou o sistema precursor de cristal líquido veiculando curcumina para ação fotodinâmica em biofilmes dentais. Este estudo contou com 30 voluntários que utilizaram dispositivos orais palatinos, contendo blocos de esmalte bovino, por 48 horas para a formação de biofilme in situ. Após esse período, os blocos de esmalte foram aleatorizados em dois grupos e metade deles foi alocada no grupo controle (somente SPCL vazio) e a outra metade foi incubada no escuro, imersa em curcumina veiculada no SPCL, e depois iluminada com um LED de luz azul (grupo PDI). Passados os tratamentos, foi determinada a UFC/ml de cada grupo, em meios de cultura preditivos para espécies de *Streptococcus* do grupo *mutans*, *Candida* spp, *Lactobacillus* e acidúricos e microbiota total específica para as condições de cultivo deste estudo. Após análise multivariada, foi observado que o tratamento teve um efeito de elevada dimensão e altamente significativo sobre a viabilidade microbiana. Procedeu-se então à ANOVA univariada, a qual revelou redução significativa nos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ nos grupos PDI em relação ao grupo controle, para todas as condições de cultivo. Foram obtidas reduções médias na ordem de 2,08; 1,34; 1,80 e 1,54 $\log_{10}$ para Chromagar *Candida*, MRS, Müller Hinton e Mitis Salivarius respectivamente. Além disso, os dados descritivos sugerem haver certa variação do efeito da PDI entre diferentes indivíduos. Esse fato foi confirmado com os resultados da análise por modelagem hierárquica. Em conclusão, a Inativação Fotodinâmica mediada pela curcumina, veiculada em SPCL foi eficaz em promover redução na viabilidade dos microrganismos presentes nos biofilmes in situ, a qual parece ser uma técnica promissora para a inativação de biofilmes dentais e para estudos clínicos futuros.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. Curcumina. Placa dentária. Cristais líquidos.

Reina BD. Curcumin-mediated photodynamic inactivation in liquid crystal precursor system on dental biofilm formed in situ [master's dissertation]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

It is estimated that more than 60% of human infections are originated by the presence of biofilms. The dental plaque, reported as the oldest biofilm, can be composed of many different species, highlighting *Lactobacillus* spp, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Photodynamic Inactivation (PDI) has been suggested as a promising therapeutic modality for the inactivation of oral microorganisms, in order to overcome the problems related to microorganism resistance and prevent adverse side effects. Previous studies have shown that curcumin is a promising photosensitizer for PDI. Nevertheless, curcumin has low solubility in aqueous solutions, therefore, this study proposed to evaluate the antimicrobial efficacy of the PDI, using the curcumin in a liquid crystal precursor system (LCPS), in dental biofilms formed in situ. This system has several advantages described in the literature, such as its bioadhesiveness at the site of action, controlled release and biocompatibility. However, no study evaluated the LCPS carrying curcumin for photodynamic action on biofilms formed in situ. This study included 30 volunteers who used oral palatal devices containing bovine enamel blocks for 48 hours for in situ biofilm formation. After that period, the enamel blocks were randomized into two groups: i. control group (empty LCPS only); ii. PDI (immersed in LCPS with curcumin in the dark and then illuminated with a blue light LED) incubated, (PDI group). After the treatments, the CFU/ml of each group was determined in culture media presumptive for *Streptococci mutans*, *Candida* spp, *Lactobacillus* spp. and aciduric species, and total microbiota, specific to the culture conditions for this study. Multivariate analysis showed that the treatment had a large and highly significant effect on microbial viability. Univariate ANOVA was then performed, which revealed a significant reduction on $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ values in the PDI groups, compared to the control group, for all the culture conditions. Mean reductions were obtained in the order of 2,08; 1,34; 1,80 e 1,54 $\log_{10}$ for Chromagar *Candida*, MRS, Müller Hinton e Mitis Salivarius respectively. In addition, the descriptive data suggest that there was some variation of the effect of the PDI between different individuals. This fact was confirmed by the results of hierarchical modeling analysis. In conclusion, curcumin-mediated photodynamic inactivation in LCPS was effective in reducing the viability of microorganisms present in in situ biofilms, which seems to be a promising technique for the inactivation of dental biofilms and for future clinical studies.

Keywords: Photochemotherapy. Curcumin. Dental Plaque. Liquid Crystals.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Biofilmes	22
3.2 Inativação Fotodinâmica e Curcumina.....	25
3.3 Sistemas de Liberação de Fármacos e Sistema Precursor de Cristal Líquido	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Delineamento Experimental e Questões Éticas.....	35
4.2 Seleção dos Participantes	35
4.3 Aquisição e Adequação dos Dentes Bovinos.....	36
4.4 Confecção do Dispositivo Intrabucal e Formação do Biofilme In Situ	37
4.5 Preparação do Sistema Precursor de Cristal Líquido.....	40
4.6 Tratamentos.....	41
4.7 Avaliação da Cinética de Liberação In Vitro da Curcumina	44
4.8 Microscopia de Fluorescência Confocal	46
4.9 Estudos Pilotos	47
4.10 Análise de Dados	48
5 RESULTADO	50
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.....	80
ANEXO B - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	84

1 INTRODUÇÃO

Tem sido estimado que mais de 60% das infecções humanas são originadas pela presença de biofilmes¹, os quais são comunidades extremamente organizadas de microrganismos aderidos a uma superfície e envoltas por uma matriz polimérica extracelular. Assim, os biofilmes podem atuar como reservatório de microrganismos patogênicos, favorecendo a disseminação das infecções, inclusive para outros sítios. Os microrganismos pertencentes a essas comunidades apresentam maior resistência às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos do que aqueles em estado planctônico, pois a ação dos fármacos é dificultada levando a maior resistência aos diferentes agentes¹⁻⁸. Um dos mecanismos relacionados com a resistência dos biofilmes a alguns fármacos é o fato de que os microrganismos que habitam as camadas internas e inferiores possuem menores taxas de metabolismo e crescimento. A falta de oxigênio e nutrientes nessas camadas os força a entrar em uma fase de crescimento estacionária, tornando-os menos susceptíveis à ação de diversos fármacos que necessitam do crescimento ativo dos patógenos⁷. Outro mecanismo de resistência é a diminuição da penetração dos fármacos pela matriz de polissacarídeos extracelulares, pois ela possui poros pequenos que não permitem a passagem de moléculas maiores de antimicrobianos⁹. Ainda, a matriz extracelular possui características hidrofílicas e aniônicas, fazendo com que não haja a penetração de uma quantidade adequada de alguns fármacos para os tecidos desejados⁹. As propriedades viscoelásticas do biofilme influenciam na penetração de fármacos e na dificuldade de remoção do biofilme das superfícies, com isso, exercem um papel importante na proteção contra desafios mecânicos e químicos¹⁰. Além disso, um biofilme pode sofrer mutações naturais ou adquirir genes de resistência, que promovem a expressão de enzimas modificadoras de antibióticos, produzindo proteínas que são alvos de antibióticos⁷.

O biofilme mais antigo descrito na literatura é a placa dentária, cuja formação^{3,11-12} se dá de forma complexa e dinâmica. Primeiramente, as bactérias do microbioma oral são trazidas até a superfície dental através do fluxo salivar natural, há a adesão dessas células bacterianas hospedeiras pioneiras ao esmalte, juntamente com glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídios, remanescentes celulares de microrganismos mortos e componentes do fluido do sulco gengival, formando a película adquirida. Esta etapa é fundamental, pois ao entrarem em

contato com a superfície dental, as moléculas salivares modificam a sua conformação, expondo receptores para a fixação bacteriana que interagem com as adesinas da parede desses microrganismos, promovendo uma adesão muito específica. Como há uma grande proximidade com a região mineralizada, são fixados microrganismos colonizadores iniciais, até as primeiras 24 horas, como cocos e bastonetes gram-positivos, principalmente espécies de *Streptococcus* e poucas bactérias gram-negativas. Essa é uma fase reversível, pois as forças físico-químicas, responsáveis pela interação entre o esmalte dental coberto pela película adquirida e os microrganismos, são fracas. Mas essas forças são rapidamente substituídas por fortes reações químicas entre as adesinas das células bacterianas e os receptores na película adquirida, havendo ligação do polímero entre os próprios microrganismos também, aumentando a ancoragem desses, originando uma fase irreversível¹².

Após essa fase, inicia-se a formação de microcolônias diversas, entre 4 a 24 horas, dando origem a um biofilme não homogêneo em espessura. Nesse período, alguns componentes do biofilme dental começam a produzir elementos da matriz desse biofilme, como por exemplo, os polissacarídeos. Essa matriz é muito importante, pois além de promover estrutura para o biofilme, auxilia na retenção de nutrientes e água¹². No período de 24 a 48 horas, há um espessamento e expansão maior do biofilme, através da co-adesão dos microrganismos pelas adesinas expressadas por eles, pela sua divisão celular e pela constante adesão de microrganismos planctônicos contidos na saliva. Com o contínuo desenvolvimento do biofilme, os colonizadores iniciais modificam o ambiente do biofilme através de seu metabolismo, criando condições favoráveis para colonizadores secundários e cada vez mais desfavoráveis para os microrganismos pioneiros. Isso se dá devido ao consumo de oxigênio e de produtos metabólicos inibitórios acumulados que tornam o ambiente mais anaeróbio. Essas modificações do ambiente fazem com que os microrganismos colonizadores iniciais sejam substituídos por bactérias diferentes, as quais são mais compatíveis às modificações do habitat; este processo ocorre nos primeiros sete dias. Progressivamente, após nove dias, as espécies aeróbias (como *Lactobacillus* spp.)¹³⁻¹⁴ e anaeróbias facultativas presentes nessas etapas iniciais do biofilme (como *Streptococcus* spp.) vão sendo gradualmente substituídas por anaeróbios facultativos e obrigatórios, cocos e bastonetes gram-negativos¹². Um biofilme maduro, caracterizado por ser uma comunidade clímax, é observado após

uma semana ou mais de sua formação e nele há um equilíbrio entre a perda e adesão de bactérias. Os microrganismos que colonizam essa comunidade podem se desprender e ficar suspensos na saliva, sendo transportados para colonizar outros sítios¹².

O biofilme dental pode ser composto por diferentes gêneros e espécies^{3,11,12}, com destaque para a atuação de *Lactobacillus*^{13,14}, que é uma bactéria aeróbica facultativa e gram positiva e de *Streptococcus* do grupo *mutans*, sendo *Streptococcus mutans* o principal agente etiológico da cárie dental^{2,3,5,12,15,16}. Embora a cárie não seja uma doença infecciosa, ela é biofilme-açúcar dependente, sendo a terceira enfermidade mais frequente no ser humano, seguida pelas cardiopatias e neoplasias^{17,18}; no Brasil, ainda é apontada como sendo a principal razão de perda do elemento dental¹⁹. O desenvolvimento dessa patologia é multifatorial, mas os microrganismos acidogênicos contidos no biofilme dental possuem papel fundamental ao realizar o metabolismo de carboidratos derivados da dieta do indivíduo, promovendo a formação de produtos finais ácidos que causam a desmineralização do esmalte dental²⁰. Também é comum a existência de biofilmes compostos por interações polimicrobianas entre bactérias e fungos²¹⁻²³, o que os tornam mais complexos e menos susceptíveis a agentes antimicrobianos^{24,25}. A espécie de fungo *Candida albicans* é o patógeno mais comumente encontrado em infecções orais e sistêmicas no ser humano^{21,23,26}, a qual possui capacidade de formação de biofilme e interações com algumas bactérias nas superfícies mucosas^{22,23,27,28} como por exemplo com *Streptococcus mutans*. A interação desses dois microrganismos também pode ocorrer no tecido dental, formando biofilmes mistos que estão associados à cárie precoce na infância²⁹. Devido a essa interação entre *C. albicans* e *S. mutans*, o ambiente do biofilme resultante é completamente modificado, com maiores quantidades de polissacarídeos extracelulares, que aumentam a massa do biofilme e concentração da infecção in vivo, resultando em um potencial cariogênico maior³⁰⁻³².

Na cavidade bucal, os biofilmes microbianos também estão associados ao desenvolvimento de outras condições patológicas, como doenças periodontais e endodônticas, candidose orofaríngea, estomatite protética, mau hálito, e peri-implantite^{3,33}. Outra implicação importante da presença de microrganismos patogênicos é o risco de infecções durante procedimentos cirúrgicos, como a endocardite bacteriana que possui muitos casos com origem na cavidade bucal e

alguns causados por procedimentos odontológicos^{34,35}. E, por essa razão, a descontaminação local com antissépticos, como a Clorexidina (CLX), é indicada previamente a tais procedimentos^{3,36}. Atualmente, a CLX é o antimicrobiano mais frequentemente utilizado tanto para descontaminação de sítios infecciosos, lesões cariosas e bolsas periodontais, como para descontaminação bucal realizada previamente a procedimentos cirúrgicos^{36,37}. Apesar de sua eficiente redução microbiana, a utilização intrabucal de enxaguatórios de CLX promove efeitos adversos, como a alteração de paladar, sensação de queimação, aumento na formação do cálculo dental, manchamento de dentes e materiais restauradores e, mais raramente, irritação das mucosas e alergias^{5,38}. Além disso, o desenvolvimento de cepas resistentes à CLX e outros antimicrobianos já vem sendo apontada na literatura³⁹⁻⁴¹. Por isso, a busca por tratamentos antimicrobianos alternativos é muito relevante nas ciências odontológicas.

Nos últimos anos, a Inativação Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Inactivation ou PDI) vem sendo apontada como modalidade terapêutica promissora para a inativação de microrganismos bucais visando sanar os problemas relacionados com a resistência dos microrganismos e não promover efeitos colaterais adversos⁴²⁻⁴⁹. O processo fotodinâmico requer a utilização de uma substância fotossensibilizadora (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS e a presença de oxigênio⁵⁰⁻⁵². O mecanismo envolve a absorção de fótons pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado ao seu estado tripleto, pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas, como oxigênio singleto e radicais livres, que são tóxicos para as células^{42,50-52}. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e a ocorrência do tipo de reação pode estar relacionada com as características do FS empregado^{53,54}.

No contexto da PDI, muitas investigações laboratoriais vêm mostrando que tanto bactérias como fungos da cavidade bucal, incluindo os envolvidos com o processo carioso, possuem susceptibilidade a diferentes protocolos dessa terapia⁵⁵⁻⁶¹. Embora o volume de informações acerca da eficácia da PDI tenha crescido de forma substancial na literatura científica internacional, ainda se percebe uma grande dificuldade em tornar a PDI uma técnica aplicável clinicamente. Uma das razões que

pode ser atribuída para tal dificuldade se referiu à utilização de culturas planctônicas nos estudos laboratoriais iniciais, as quais, comprovadamente, necessitam de concentrações de antimicrobianos 10 a 1000 vezes menores para sua eliminação, em comparação com os biofilmes^{62,63}. Além disso, quando os estudos se propõem a investigar o efeito sobre biofilmes, os modelos in vitro normalmente utilizados são muito distantes da realidade intrabucal, como é o caso dos modelos estáticos e a formação de biofilmes com apenas uma ou duas espécies microbianas^{6,64-66}. Nessas situações, as conclusões extraídas dos experimentos são muitas vezes difíceis de serem transferidas diretamente para a situação in vivo e, portanto, nem sempre permitem a definição de um protocolo clínico da terapia. Assim, modelos de formação de biofilme in situ têm sido indicados como método adequado para se estudar tanto a arquitetura e a fisiologia da formação do biofilme sobre estrutura dental e restauradora^{60,67-71} como o efeito de agentes antimicrobianos sobre biofilmes^{48,72}.

Estudos prévios conduzidos dentro^{48,56,72,73} e fora de nosso grupo de pesquisa mostraram que a Curcumina, um pigmento natural extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa* L.⁷⁴ possui alta capacidade de absorção de luz em comprimentos de onda próximos ao azul, exercendo efeitos fototóxicos potentes em quantidades micromolares^{56,75-82}. Além disso, a Curcuminapossui propriedades fotodinâmicas para a eliminação de microrganismos em biofilmes superficiais, uma vez que estes não requerem profunda penetração da luz nos tecidos para seu tratamento. Ainda, foi comprovada a ausência de toxicidade da curcumina em várias culturas celulares e em animais que, somada ao seu baixo custo, manipulação simples e alta efetividade, tornam a Curcumina um promissor fotossensibilizador⁷⁵. Apesar de seu grande potencial, a Curcumina apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas^{56,76,83}. A alternativa utilizada nos estudos para sua solubilização é a sua dissolução do pó em DMSO ou etanol, previamente à incorporação de água^{84,85}. No entanto, a utilização clínica desses solventes não é desejável, pois são citotóxicos e podem causar danos às estruturas de membranas e paredes celulares, não sendo viável para uso in vivo^{86,87}.

Como alternativa para solubilização de fármacos, os sistemas de liberação nanoestruturados bioadesivos têm surgido com importante destaque, pois se tratam de formulações formadas por polímeros bioadesivos com o objetivo de aumentar o contato da formulação com o tecido de absorção, liberando o fármaco próximo do

local de ação, promovendo um aumento da permeação do fármaco, melhorando, dessa forma, a sua biodisponibilidade e ação farmacológica⁸⁸⁻⁹⁵. Há diversos estudos que sugerem a utilização desses sistemas como possível utilização em diversas terapias, como por exemplo, para veiculação de antirretrovirais⁹⁶⁻⁹⁷, para o controle de biofilmes microbianos⁷ como biofilmes de *S. mutans*⁹⁸, descontaminação periodontal⁹⁹, analgesia pós-operatória¹⁰⁰, para infecções de pele¹⁰¹ e para a prevenção de cáries¹⁰².

Entre esses sistemas, podemos destacar o sistema precursor de cristal líquido que é constituído por surfactantes que, através da adição gradativa de solventes como a água, adquire conformações líquidas cristalinas, lamelares, hexagonais e cúbicas^{103,104}, ou seja, a adição de água aumenta o grau de organização desse sistema e conseqüentemente, aumenta a sua viscosidade. Dessa forma, pode ser um sistema vantajoso para incorporação de fármacos bucais, pois devido à sua forma inicial líquida, possui fácil administração e após entrar em contato com a cavidade oral, pode incorporar a água da saliva, tornando a formulação mais viscosa, aderindo e permanecendo por mais tempo nas superfícies dentais e mucosas¹⁰²⁻¹⁰⁴, além de não possuir toxicidade aos tecidos humanos¹⁰². Alguns estudos já vêm utilizando sistemas precursores de cristal líquido para veiculação de Curcumina^{102,104,105}. O fato desse tipo de sistema possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas, possibilita uma grande capacidade de solubilização da Curcumina, podendo protegê-la contra a degradação térmica, aumentando sua estabilidade física, além de controlar a sua liberação^{95,106-108}. No entanto, até o momento não são encontrados dados acerca da susceptibilidade de biofilmes dentais formados *in situ* à ação fotodinâmica da Curcumina quando veiculada em sistemas precursores de cristais líquidos.

7 CONCLUSÃO

Considerando todos os aspectos discutidos no presente estudo, podemos concluir que a PDI, mediada pela curcumina em sistema precursor de cristal líquido, foi eficaz para promover redução na viabilidade de microrganismos presentes em biofilmes dentais formados in situ. Além disso, a análise hierárquica confirmou haver diferenças individuais na eficácia da PDI. Esse estudo abre portas para investigações futuras, voltadas para o âmbito clínico, para que seja determinado um protocolo de uso eficaz dessa terapia.

REFERÊNCIAS*

1. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4): 999-1007.
2. Al Maghlouth A, Al Youself Y, Al Bagieh N. Qualitative and quantitative analysis of bacterial aerosols. *Creat Enterp Math Teach Res Elem Methodol Pract - From Teach to Teach*. 2004; 5(4): 171-8.
3. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections: an update. *Apmis*. 2017; 125(4): 376-84.
4. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 7–15.
5. Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen IŞ. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 1-8.
6. Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N. In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches. *Microsc Sci Technol Appl Educ*. 2010: 597-606.
7. Dos Santos Ramos MA, Da Silva PB, Spósito L, De Toledo LG, Bonifácio BV, Rodero CF et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: A review. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:1179-213.
8. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 85-105.
9. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(11): 965-74.
10. Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39(2): 234-45.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
12. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 199-215.
13. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RSS, Graciano AX et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012; 9(2): 122-31.
14. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994; 73(3): 672-81.

* 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>

15. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50(9): 353-80.
16. Hasan S, Danishuddin M, Adil M, Singh K, Verma PK, Khan AU. Efficacy of *E. officinalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*: A novel and alternative approach to suppress Quorum-sensing mechanism. PLoS One. 2012; 7(7): 1-12.
17. Petersen PE. The world oral health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. 2003; 31(1): 3–24.
18. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. Lancet. 2016; 388(10053): 1545-602.
19. Roncalli AG. Projeto SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal revela importante redução da cárie dentária no país. Cad Saúde Pública. 2011; 27(1): 4-5.
20. Svensäter G, Borgström M, Bowden GHW, Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. Caries Res. 2003; 37(6): 395-403.
21. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2012; 19(11): 557-63.
22. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2009; 299(1): 1-8.
23. Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. Mol Oral Microbiol. 2014; 29(3): 99-116.
24. Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Andes D, Vand Dijck P, Jabra-Rizk MA. Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. 2016; 7(5): 1-12.
25. Townsend EM, Sherry L, Kean R, Hansom D, Mackay WG, Williams C et al. Implications of antimicrobial combinations in complex wound biofilms containing fungi. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(9): 1-5.
26. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: A well-designed protected environment. Med Mycol. 2005; 43(3): 191-208.
27. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(5): 340-49.
28. Förster TM, Mogavero S, Dräger A, Graf K, Polke M, Jacobsen ID et al. Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria. Cell Microbiol. 2016; 18(12): 1709-15.
29. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. Mol Oral Microbiol. 2017; 32: 24–34.

30. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-81.
31. Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan DJ, Koo H. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog*. 2017; 13(6): 1-25.
32. Kim D, Sengupta A, Niepa THR, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep*. 2017; 7: 1-14.
33. Frédéric LJ, Michel B, Selenia T. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials (Basel)*. 2018; 11(10): 1-17.
34. Bayliss R, Clarke C, Oakley C, Somerville W, Whitfield AGW. The teeth and infective endocarditis. *Heart*. 1983; 50(6): 506-12.
35. Birlutiu V, Birlutiu RM, Costache VS. Viridans streptococcal infective endocarditis associated with fixed orthodontic appliance managed surgically by mitral valve plasty. *Med (United States)*. 2018; 97(27).
36. Summers AN, Larson DL, Edmiston CE, Gosain AK, Denny AD, Radke L. Efficacy of preoperative decontamination of the oral cavity. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 106(4): 895-900.
37. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Antiplaque effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: A randomised clinical trial. *PLoS One*. 2015; 10(2): 1-18.
38. Peridex™ (CHLORHEXIDINE GLUCONATE 0.12%) ORAL RINSE. [acesso 4 abril 2019]. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/019028s020lbl.pdf.
39. Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, Ainsworth AJ, Patrick C, Martin MS et al. Mupirocin and chlorhexidine resistance in *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 559-68.
40. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12(1): 147-79.
41. Renwick MJ, Simpkin V, Mossialos E. Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development: The need for a One Health – One Europe – One World Framework [livro na Internet]. Copenhagen (Denmark): European Observatory on Health Systems and Policies; 2016. [acesso 2019 abr 03]
42. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55(1):143-66.
43. Miranda RG, Gusman HDS, Colombo APV. Antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus PDT against intracanal *Candida albicans*: an ex vivo study. *Braz. oral res*. 2015; 29 (1): 1-7.

44. Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I et al. Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2013; 48(5): 591-9.
45. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko 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.
46. Kato TI, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(1): 445-51.
47. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-Mouth Disinfection by photodynamic therapy using Curcumin. Photomed Laser Surg. 2012; 30(2): 96-101.
48. Dovigo LN, Carmello JC, De Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. Med Mycol. 2013; 51(3): 243-51.
49. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother. 1998; 42: 13- 28.
50. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol. 1992; 55: 145-57.
51. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. Lasers Surg Med. 2002; 31(2): 86-90.
52. Al-Watban FA, Zhang XY. Terapia fotodinâmica de camundongos nus indiferenciados humanos portadores de carcinoma da tireoide usando ácido 5-aminolevulínico tópico. Photomed Laser Surg. 2005; 23: 206–11.
53. Tardivo JP, Giglio AD, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basics mechanisms to clinical applications. Photodiag Photochem Therapy. 2005; 2:175-91.
54. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti M, Baptista MS. Modulation of the methylene blue photochemical properties based on the adsorption at aqueous micelle interfaces. Phys Chem Chem Phys. 2002; 4: 2320-8
55. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. Int J Mol Sci. 2015; 16(9): 20523-59.
56. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. Lasers Surg Med. 2011; 43(9): 927-34.
57. Wilson M, Mia N. Sensitization of *Candida albicans* to Killing by low power laser light. J Oral Pathol Med 1993; 22: 354–7.
58. Fontana CR, Abernathy AD, Som S, Ruggerio K, Doucette S, Marcantonio RC et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. J Periodontal Res. 2009; 44: 751–9.

59. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M et al. In vitro fungicidal photodynamic effect of hipericin on *Candida* species. *Photochem Photobiol.* 2012; 88: 613-9.
60. Panhóca VH, Florez F, Batista de Faria N Júnior, Rastelli AN, Tanomaru J, Kurachi C et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm in situ. *J Contemp Dent Pract.* 2016; 17(3): 184-91.
61. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J et al. In vitro effect photodynamic therapy with differents photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol.* 2015; 15: 187.
62. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 997-1009.
63. Wei GX, Campagns AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(6): 1100–9.
64. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43(3): 313-51.
65. Rolim JPML, de-Melo MAS, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NAP et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 2012; 106: 40-6.
66. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Laser Surg Med.* 2012; 44: 588–96.
67. Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(8): 790–5.
68. Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of *Streptococci* and *Actinomyces* detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003; 185(11): 3400–9.
69. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol.* 2006; 51 (11): 1006—14.
70. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. In situ identification of *Streptococci* and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115 (6): 459–67.
71. Tahmassebi JF, Drogkari E, Wood SR. A study of the control of oral plaque biofilms via antibacterial photodynamic therapy. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015; 16(6): 433-40.

72. Santezi C. Eficácia da inativação fotodinâmica mediada pela curcumina sobre biofilme dental e avaliação de possíveis alterações nas propriedades de materiais restauradores resinosos e esmalte dental. [tese na Internet]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2016 [acesso em 2019 maio 13]. Disponível em:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/144333/santezineto_c_dr_arafo_i nt.pdf?sequence=6&isAllowed=y
73. Santezi C, Reina BD, Dovigo LN. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections — A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018; 21: 409–15.
74. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 2010; 103 (11): 1545-57.
75. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XL. Pharmazie* 2010; 65: 600-6.
76. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87 (4): 895-903.
77. Santezi C, Tanomaru JM, Bagnato VS, Júnior OB, Dovigo LN. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016; 15:46-52.
78. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(2): 391-8.
79. Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Sci Rep*. 2016; 21; 6:24797.
80. Sanitá PV, Pavarina AC, Dovigo LN, Ribeiro APD, Andrade MC, Mima EGO. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(4): 709-17.
81. Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(1): 1-6.
82. Araújo NC, de Menezes RF, Carneiro VSM, Dos Santos-Neto AP, Fontana CR, Bagnato VS et al. Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35(5): 259-63.
83. Nguyen TNG, Tran PHL, Van Vo T, Van Tran T, Tran TTD. Dissolution enhancement of curcumin by solid dispersion with polyethylene glycol 6000 and hydroxypropyl methylcellulose. Springer International Publishing. 2015: 298–301.
84. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol*. 1989; 151: 183-5.

85. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 1994; 59: 290-4.
86. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, Crowe LM. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1104 (1): 117–22.
87. Bruzell EM, Morisbak E, Tonnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4 (7): 523–30.
88. Woodley, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40(2): 77-84.
89. Hägerström, H. Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery [Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutics] .Uppsala: Uppsala University, 2003. [acesso em 2018 nov 7]. Disponível em:
<http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:163176/FULLTEXT01.pdf>
90. Gosenca M, Bešter-Rogač M, Gašperlin M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 50(1): 114–22.
91. Calixto G, Bernegossi J, Fonseca-Santos B, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 3719.
92. Bonifácio BV, da Silva PB, dos Santos Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9:1–15.
93. Oliveira MB, do Prado AH, Bernegossi J et al. Topical application of retinyl palmitate-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 632570. doi: /10.1155/2014/632570
94. Carvalho FC, Chorilli M, Gremião MPD. Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. *Polímeros.* 2014; 24(2): 203-13.
95. Salmazi R, Calixto G, Bernegossi J, Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 4815–24.
96. Carvalho FC, Barbi MS, Sarmiento VH, Chiavacci LA, Netto FM, Gremião MP. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(4): 430-9.
97. Carvalho FC, Campos ML, Peccinini RG, Gremião MP. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 84(1): 219-27.

98. Calixto GMF, Duque C, Aida KL, Dos Santos VR, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025-loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2017; 19(13): 31-41.
99. Lacević A, Vranić E, Zulić I. Endodontic-periodontal locally delivered antibiotics. *Bosn J Basic Med Sci*. 2004; 4(1): 73-8.
100. Mei L, Xie Y, Huang Y, Wang B, Chen J, Quan G et al. Injectable in situ forming gel based on lyotropic liquid crystal for persistent postoperative analgesia. *Acta Biomater*. 2018; 67: 99-110.
101. Victorelli FD, Calixto GMF, Ramos MADS, Bauab TM, Chorilli M. Metronidazole-Loaded Polyethyleneimine and Chitosan-Based Liquid Crystalline System for Treatment of *Staphylococcal* Skin Infections. *J Biomed Nanotechnol*. 2018; 14(1): 227-37.
102. Aida KL, Kreling PF, Caiaffa KS, Calixto GMF, Chorilli M, Spolidorio DM et al. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 3081-91.
103. Calixto GMF, Garcia MH, Cilli EM, Chiavacci LA, Chorilli M. Design and characterization of a novel p1025 peptide-loaded liquid crystalline system for the treatment of dental caries. *Molecules*. 2016; 21(2): 158.
104. Calixto GMF. Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal [tese na Internet]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2017 [acesso em 2019 jan 20]. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/148946/calixtro_gmf_dr_arafcf_int.pdf?sequence=6&isAllowed=y.
105. Wu X, Xu J, Huang X, Wen C. Self-microemulsifying drug delivery system improves curcumin dissolution and bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011; 37(1): 15-23.
106. de Freitas ES, da Silva PB, Chorilli M, Batista AA, Lopes EO, da Silva MM et al. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium (II) compounds. *Molecules*. 2014; 19: 5999-6008.
107. Carvalho FC, Sarmiento VH, Chiavacci LA, Barbi MS, Gremião MP. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. *J Pharm Sci*. 2010; 99(5): 2367-74.
108. Victorelli FD, Calixto G, Chorilli M. Desenvolvimento de sistemas líquidos cristalinos utilizando dispersão de quitosana e polietilenoimina como fase aquosa para liberação de fármacos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2014; 35(1).
109. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*. 2013; 121(136): 1–58.
110. Burmølle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sørensen SJ. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol*. 2014; 22(2): 84–91.
111. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 623–33.

112. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13(1): 20–6.
113. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987; 95(5): 369–80.
114. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(11): 5721-32.
115. Costello E K, Lauber C L, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326: 1694–7.
116. Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480–4.
117. Franzosa E A, Huang K, Meadow JF, Gevers D, Lemon KP, Bohannan BJ et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2930E2938.
118. Davies M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003; 305: 761–70.
119. Kim D, Liu Y, Benhamou RI, Sanchez H, Simón-Soro Á, Li Y et al. Bacterial-derived exopolysaccharides enhance antifungal drug tolerance in a cross-kingdom oral biofilm. *ISME J*. 2018; 12(6): 1427-42.
120. García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83522.
121. Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Devices for in situ development of non-disturbed oral biofilm. A Systematic Review. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1055.
122. Rupf S, Laczny CC, Galata V, Backes C, Keller A, Umanskaya N et al. Comparison of initial oral microbiomes of young adults with and without cavitated dentin caries lesions using an in situ biofilm model. *Nature* 2018; 8: 14010
123. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004; 17(3): 245-54.
124. Marian CM. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci*. 2012; 2: 187–203.
125. Girotti AW. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B*. 2001; 63(1-3): 103-13.
126. Magi B, Ettorre A, Liberatori S, Bini L, Andreassi M, Frosali S et al. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: A cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ*. 2004; 11: 842–52.

127. Chen Y, Zheng W, Li Y, Zhong J, Ji J, Shen P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci.* 2008; 99(10): 2019-27.
128. Alves E, Santos N, Melo T, Maciel E, Dória ML, Faustino MA et al. Photodynamic oxidation of *Escherichia coli* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013; 27: 2717-28.
129. da Silva EFF, Pedersen BW, Breitenbach T, Toftegaard R, Kuimova MK, Arnaut LG et al. Irradiation- and sensitizer-dependent changes in the lifetime of intracellular singlet oxygen produced in a photosensitized process. *J Phys Chem B.* 2012; 116(1): 445-61.
130. Baier J, Maier M, Engl R, Landthaler M, Bäuml W. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *J Phys Chem B.* 2005; 109(7): 3041-6.
131. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference.* 1995; 24(2): 663-77.
132. Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 2006; 82(5): 1178-86.
133. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009; 11(13): 1050-62.
134. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel).* 2011; 3(2): 2516-39.
135. Kessel D, Castelli M, Reiners JJ. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ.* 2005; 12(5): 502-11.
136. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(2): 629-35.
137. Guglielmi C de A, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt.* 2011; 16(8): 088003.
138. Longo JPF, Leal SC, Simioni AR, Almeida-Santos Menezes M. de Fátima, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med. Sci.* 2012; 27: 575-84.
139. Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 18: 54-62.
140. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, Moriyama LT, Bagnato VS, de Moraes IG. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *Int Endod J.* 2019, doi: 10.1111/iej.13092.

141. Al-Ahmad A, Bucher M, Anderson AC, Tennert C, Hellwig E, Wittmer A. Antimicrobial photoinactivation using visible light plus water-filtered infrared-A (VIS + wIRA) alters in situ oral biofilms. PLoS One. 2015; 10(7): e0132107.
142. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(3): 392-401.
143. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. Molecules. 2018; 23(8).
144. Pourhajibagher M, Chiniforush N, Monzavi A, Barikani H, Monzavi MM, Sobhani S et al. Inhibitory effects of antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on biofilm-associated gene expression profile of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Dent. 2018; 15(3): 169–77.
145. Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. PLoS One. 2017; 12(11): e0187418.
146. Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. Photomed Laser Surg. 2014; 32(11): 627-32.
147. Hegge AB, Vukicevic M, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoides L. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2013; 83: 95–105.
148. Ricci Donato HA, Pratavieira S, Grecco C, Brugnara-Júnior A, Bagnato VS, Kurachi C. Clinical. Comparison of two photosensitizers for oral cavity decontamination. Photomed Laser Surg. 2017; 35(2): 105-10.
149. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer. 2005; 41(13): 1955-68.
150. Prasad S, Tyagi K, Aggarwal BB. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. Cancer Res Treat. 2014; 46(1): 2-18.
151. Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2014; 39: 113-204.
152. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. Biomed Res Int. 2014; 2014: 186864.
153. Lai PK, Roy J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. Current Medicinal Chemistry. 2004; 11(11): 1451–60.
154. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res. 2003; 23(1A): 363-98.

155. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin--effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoids XLVII. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47(1): 65-74.
156. Hamam F, Al-Remawi M. Novel delivery system of curcumin through transdermal route using sub-micronized particles composed of mesoporous silica and oleic acid. *Journal of Functional Foods.* 2014; 8: 87-99.
157. Zhang D, Luo J, Yan D, Jin C, Dong X, Xiao X. Effects of Two Curcuminoids on *Candida albicans*. *Chinese Herbal Medicines.* 2012; 4(3): 205-12.
158. Dorai T, Gehani N, Katz A. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer- I. curcumin induces apoptosis in both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2000; 3: 84-93.
159. Kuo M, Huang T, Lin J. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1996; 1317: 95-100.
160. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(9): 1040-61.
161. Tsvetkov P, Asher G, Reiss V, Shaul Y, Sachs L, Lotem J. Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(15): 5535-40.
162. Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement JP. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett.* 2001; 495(1-2): 131-6.
163. Nasra MMA, Khiri HM, Hazzah HA, Abdallah OY. Formulation, in-vitro characterization and clinical evaluation of curcumin in-situ gel for treatment of periodontitis. *Drug Delivery.* 2017; 24(1): 133-42.
164. Vieira TM, Dos Santos IA, Silva TS, Martins CHG, Crotti AEM. Antimicrobial activity of monoketone curcuminoids against cariogenic bacteria. *Chem Biodivers.* 2018; 15(8): e1800216.
165. Sodagar A, Bahador A, Pourhajibagher M, Ahmadi B, Baghaeian P. Effect of addition of curcumin nanoparticles on antimicrobial property and shear bond strength of orthodontic composite to bovine enamel. *J Dent (Tehran).* 2016; 13(5): 373-82.
166. Maghsoudi A, Yazdian F, Shahmoradi S, Ghaderi L, Hemati M, Amoabediny G. Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: Optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 75: 1259-67.
167. Loo CY, Rohanizadeh R, Young PM, Traini D, Cavaliere R, Whitchurch CB et al. Combination of silver nanoparticles and curcumin nanoparticles for enhanced anti-biofilm Activities. *J Agric Food Chem.* 2016; 64(12): 2513-22.
168. Tonnesen HH, Karlsen J, Henegouwen GB. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1986; 183: 116-122.

169. Chan WH, Wu HJ. Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem.* 2004; 92(1): 200-12.
170. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis.* 2018; 24(4): 518-26.
171. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-18.
172. Saheb M, Fereydouni N, Nemati S, Barreto GE, Johnston TP, Sahebkar A. Chitosan-based delivery systems for curcumin: a review of pharmacodynamic and pharmacokinetic aspects. *J Cell Physiol.* 2019; 30.
173. Ansari MJ, Ahmad S, Kohli K, Ali J, Khar RK. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 39(1-2): 132-8.
174. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA, Gremião MPD, Oliveira AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2005; 41(3): 301-13.
175. Liu CH, Huang HY. Antimicrobial activity of curcumin-loaded myristic acid microemulsions against *Staphylococcus epidermidis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2012; 60(9): 1118-24.
176. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(11): 1556-68.
177. Andrews GP, Laverty TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(3): 505-18.
178. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(1): 89–100.
179. Carvalho FC, Calixto G, Hatakeyama IN, Luz GM, Gremião MP, Chorilli M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013; 39(11): 1750-7.
180. Zhao J, Gulan U, Horie T, Ohmura N, Han J, Yang C et al. Advances in biological liquid crystals. *Small.* 2019; e1900019.
181. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Scarpa MV. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de copolímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química Nova.* 2009; 32(4): 1036-40.
182. Chaudhary K, Kannoja P, Mishra N. *Liquid Crystal Systems in Drug Delivery.* 1st ed. Hershey: IGI Global; c2016. p. 217-243.
183. Rodero CF, Calixto GMF, dos Santos KC, Sato MR, dos Santos Ramos MA, Miró MS et al. Curcumin-loaded liquid crystalline systems for controlled drug release and improved treatment of vulvovaginal candidiasis. *Molecular pharmaceutics.* 2018; 15(10): 4491-504.

184. Streck L, Sarmiento VH, Machado PR, Farias KJ, Fernandes-Pedrosa MF, da Silva-Júnior AA. Phase transitions of isotropic to anisotropic biocompatible lipid-based drug delivery systems overcoming insoluble benznidazole loading. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(7).
185. Kakkar V, Singh S, Singla D, Sahwney S, Chauhan AS, Singh G et al. Pharmacokinetic applicability of a validated liquid chromatography tandem mass spectroscopy method for orally administered curcumin loaded solid lipid nanoparticles to rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(32): 3427-31.
186. Li R, Qiao X, Li Q, He R, Ye M, Xiang C et al. Metabolic and pharmacokinetic studies of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in mice tumor after intragastric administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(26): 2751-8.
187. Tsai YM, Jan WC, Chien CF, Lee WC, Lin LC, Tsai TH. Optimised nano-formulation on the bioavailability of hydrophobic polyphenol, curcumin, in freely-moving rats. *Food Chem.* 2011; 127(3): 918-25.
188. Moi GP. Análise do perfil proteômico do biofilme dental formado in situ na presença de glicose + frutose e sacarose. [tese na Internet]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, 2010. [acesso em 2019 mai 13]. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/289246>
189. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (2): 147-52.
190. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37(5): 339–44.
191. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res.* 2010; 44: 349–57.
192. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006; 40(1): 28-32.
193. Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Del Bel Cury AA, Cury JA. In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. *J Oral Sci.* 2007; 49(2): 147-54.
194. Aires CP, Del BelCury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42 (5): 380–6.
195. Cury JA, Rebello MAB, Del BelCury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31(5): 356–60.
196. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology.* 2009; 155(7): 2116-26.

197. Hu W, Murata K, Zhang D. Applicability of LIVE/DEAD BacLight stain with glutaraldehyde fixation for the measurement of bacterial abundance and viability in rainwater. *Journal of Environmental Sciences*. 51: 202-13.
198. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(3): 841-50.
199. LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kits [manual na internet]. [acesso 2019 10 abril] Disponível em: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp07007.pdf&title=TEIWRSYjNDc7REVBRCAmbHQ7aSZndDtCYWMmbHQ7L2kmZ3Q7TGlnaHQgQmFjdGVyaWFsIFZpYWJpbGl0eSBLaXRz>
200. Fermanian J. Measure de l'acord entre deux juges casquantitatif. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1984; 32: 408-13.
201. Fisher RA. Intraclass correlations on the analysis of variance. In: Fisher RA Statistical methods of research workers. 14th ed. Edinburg: Oliver and Boyd. 1970; 213-49.
202. Maroco J. Modelos Lineares Hierárquicos. In: *Análise Estatística com o PASW Statistics*. 7th ed. Pêro Pinheiro: ReportNumber Análise e Gestão de Informação Lda; 2012.