



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



Tatiane Miranda Manzoli

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

Araraquara

2019



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



Tatiane Miranda Manzoli

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

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

Orientador: Prof^a Dr^a Livia Nordi Dovigo

Araraquara

2019

Manzoli, Tatiane Miranda

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

65 f. ; 30 cm.

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

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

Tatiane Miranda Manzoli

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Prof^aDr^a Lívia Nordi Dovigo

Prof^a Dr^a Andrea Abi Rached Dantas

Prof.Dr. Elídio Rodrigues Neto

Araraquara, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Tatiane Miranda Manzoli

NASCIMENTO: 19/06/1993 – Cacoal/Ro

FILIAÇÃO: Luzenir Rosa Miranda Manzoli
Valdemir Manzoli

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

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

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

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

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

(O Rei Leão)

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

RESUMO

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

Palavras – chave: Curcumina. Fotoquimioterapia. Saliva.

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

ABSTRACT

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

Keywords: Curcumin. Photochemotherapy. Saliva.

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi investigar o efeito antimicrobiano da PDI utilizando a CUR em um sistema CL sobre amostras de saliva humana. Os objetivos específicos foram:

Avaliar a PDI mediada pela CUR em sistema CL contendo ácido oleico para redução microbiana, especificamente para inativação de espécies identificadas em meios seletivos presuntivos para *Streptococcus* do grupo mutans, *L. casei* e outras espécies acidófilas e *Candida* spp.

Comparar o efeito fotodinâmico promovido pela CUR em sistema CL e em DMSO.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antimicrobianos

No trabalho de Loesche⁵⁹, em 1996, o autor realizou uma revisão de literatura sobre a utilização de antimicrobianos na odontologia e a resistência dos microrganismos. Segundo as informações relatadas, a utilização de antimicrobianos sistêmicos se tornou um padrão com o tempo. O risco de infecções pós-operatórias em cirurgias periodontais é baixo e não justifica a profilaxia com antimicrobianos sistêmicos. A recomendação é apenas em procedimentos com uma alta taxa de infecção. Por conta da ideologia de que cárie e doença periodontal teriam sua etiologia pelo crescimento de microrganismos na placa dentária, o uso de antimicrobianos não foi tão abusivo, pois entendia-se que a solução seria o desbridamento mecânico. No século XXI, porém, surgiu a ideologia de que essas patologias são infecções bacterianas específicas, embora crônicas. Também relatou em seu estudo que as placas dentárias se diferem bacteriologicamente em locais doentes de locais saudáveis. Microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* podem ser encontrados em saliva e amostras de placa de indivíduos saudáveis. Relatou em seu estudo que a preocupação imediata é que antimicrobianos, se forem usados em terapias odontológicas, deverão ter foco de eliminação em espécies específicas associadas à doença. Por conta de doença coronariana e acidente vascular cerebral associadas com doença periodontal, precisa-se avaliar melhor as formas terapêuticas. Os trabalhos vistos pelo autor sobre formas de tratamento levaram a concluir que existe a necessidade de um diagnóstico da infecção e a escolha do antimicrobiano. Os antimicrobianos são agentes poderosos quando usados de maneira bem focada.

No trabalho de Balbuena et al.⁶⁰, em 1998, os pesquisadores avaliaram 30 voluntários para ajudar a identificar um antisséptico oral que poderia reduzir colônias bacterianas da saliva humana. Os antissépticos usados foram Listerine e Peridex. Foi precedida uma lavagem inicial com solução salina, para determinar a contagem de colônias bacterianas normais, seguida por duas lavagens (1 hr e 4 hrs após o enxaguatório), para determinação da quantidade de colônias bacterianas. Após o procedimento descrito, todos os enxaguamentos de cultura foram embalados em gelo a 4°C e foram plaqueados. Cada diluição foi inoculada em uma placa de ágar sangue de ovelha a 5% para cultura de aeróbica e ágar sangue para cultura anaeróbica. As culturas aeróbicas foram incubadas durante 24 hrs a 37°C, e as anaeróbicas colocadas em frascos de GASPAC e incubadas durante 48hrs na mesma incubadora. Os resultados mostraram que o enxaguatório Peridex teve uma diminuição significativa de bactérias aeróbicas e anaeróbicas comparado com solução salina. O listerine reduziu 65% em bactérias aeróbicas e anaeróbicas após 1 hr de tratamento, as 4 hrs as contagens aumentaram. Por isso não havia diferença

significativa entre listerine e solução salina após 4 hrs. Não houve diferença significativa entre listerine e Peridex com 1 hr do tratamento, apenas com 4 hrs. Portanto, concluíram que Listerine anti-séptico e o enxaguante oral Peridex reduzem o número de bactérias na saliva humana após aplicação tópica em voluntários saudáveis. O Peridex tem maior tempo de ação, sendo assim seria um agente ideal para aplicação clínica.

No trabalho de Chen et al.⁶¹, em 2010, os pesquisadores avaliaram a curcumina para redução viral. Para isso, o estudo utilizou vírus da gripe humana PR8 (H1N1) e vírus da gripe aviária A (H6N1), sendo propagados em células MDCK. A curcumina obtida foi dissolvida em DMSO e armazenada em -80°C. Para avaliar a citotoxicidade, as células MDCK foram mensuradas com base na proliferação e viabilidade celular. O CC50 (concentração de fármacos que inibiam o crescimento celular em 50% em relação ao controle não tratado) foi de, aproximadamente, 43uM e nenhum efeito tóxico celular significativo foi observado abaixo de 30uM. Para avaliar o efeito da curcumina sobre a replicação do vírus, o meio de cultura celular foi suplementado com variadas concentrações de curcumina 8h antes da infecção e depois sendo mantidas durante o experimento. A produção de vírus foi significativamente reduzida no tratamento com curcuminana concentração de 30 uM. A curcumina foi adicionada às células MDCK em três momentos: antes da infecção (pré-tratamento), ao mesmo tempo em que a infecção com o vírus (simultaneamente), ou em 2 HPI (após a entrada). As células MDCK pré-tratadas com curcumina 8h antes da infecção (mas removidas pouco antes da infecção pelo vírus) reduziram a produção de vírus para 20%. A adição de curcumina simultânea com o vírus resultou em uma inibição muito mais forte do que a das células pré-tratadas com curcumina a 18 e 24 HPI. Outro ponto importante foi que a adição de curcumina 2 h após a infecção reduziu o grau de inibição (no caso dos pontos de tempo de 18 e 24 h de volta para os níveis de pré-tratamento). Isto sugeriu que a curcumina pode interferir com a partícula do vírus, impedindo assim a infecção. Os componentes dos curcumoides foram separados por HPLC e a atividade antiviral de três curcuminoídes purificados, foi inicialmente confirmada pelo ensaio de redução da placa, sendo os grupos: Curcumina (curcumina, 77%), demetoxicurcumina (curcumina, 17%) e bisdemetoxicurcumina (curcumina, 3%). Através dos resultados observaram que, a curcumina interrompe a condução do vírus, inibindo assim a propagação da gripe, embora não seja certo que tenha interação direta com a proteína viral ou com outros componentes virais. Através disso, os autores concluíram que a curcumina tem mostrado ser um promissor antiviral.

No trabalho realizado por Marsh⁶², em 2010, o autor realizou uma revisão de literatura sobre o modo de ação e os compostos utilizados para o controle de biofilme. Segundo as informações relatadas, as propriedades contidas nos biofilmes são diferentes daquelas em estado planctônico. Contém um fenótipo no biofilme que é tolerante a agentes antimicrobianos, estresse e defesas do hospedeiro, sendo assim mais resistentes aos tratamentos. Também apontaram que, a mudança ambiental faz com que

ocorra na microflora competitividade entre as bactérias. Os carboidratos fazem com que a placa bacteriana fique mais tempo em um baixo pH, fazendo com que o ambiente seja mais propício para microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Lactobacilos* e outros acidófilos. Relatou em seu estudo que, o tempo ideal de uma agente antimicrobiano na cavidade oral é de até 2 min e os componentes ativos presentes nele tem que agir ao longo do tempo na cavidade oral após reter nas superfícies dentárias. Estudos mostram que organismos tem sensibilidade aos antibióticos, dependendo de sua fixação e tempo de contato, o triclosan por exemplo, mostrou-se muito mais ativo contra anaeróbicos gram-negativos, enquanto gram-positivos com MIC similar não eram afetados. Estudos mostraram também que a clorexidina tem amplo espectro contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras, podendo ajudar no controle de placa, cárie e gengivite. Ela age em *Streptococcus cariogênicos* e em *Porphyromonas gengivalis*. Um modo de ação encontrado na grande maioria é a inibição seletiva do crescimento metabólico de organismos que implicam nas doenças, enquanto os associados à saúde são pouco afetados. Foi concluído com esse trabalho que há diferença nos antimicrobianos e nos antibióticos. Os produtos de higiene oral têm como finalidade controlar a placa dentária, em vez de elimina-la.

No trabalho realizado por Gunsolley⁶³, em 2010, o pesquisador realizou uma revisão sistemática e um ensaio clínico para avaliar os efeitos dos enxaguatórios bucais anti-placa e anti-gengivite. Para isso, um ensaio clínico de 6 meses com bochechos de óleos essenciais, cloreto de triclosan, clorexidina (CHX) e cloreto de cetilperidínio (CPC) foram utilizados. As revisões analisadas tiveram em seu estudo bochechos com agentes ativos de clorexidina, óleos essenciais, cloreto de cetilpiridínio e cremes dentais com triclosan e fluoreto de estanho. Tiveram evidências conclusivas de eficácia estudos com clorexidina e óleos essenciais como agentes anti-placa e anti-gengivite. Para resultados com CPC, teve variação por conta de diferentes formulações testadas. Para avaliar a eficácia dos bochechos, foi feita uma redução percentual, sendo avaliado o resultado da medida de redução comparando com o nível remanescente de placa do grupo controle. Essa forma de medida é um padrão usado pela ADA. Apontou em seu estudo que, enxaguatórios bucais com CHX são eficazes antiplaquetários e anti-gengivite, já resultados com CPC foram de difíceis conclusões, pois tem formulações diferentes entre as pesquisas. Através de seu estudo pôde concluir que enxaguatórios bucais mostraram-se eficazes e devem ser adicionados à higiene oral.

Segundo um trabalho de revisão elaborado por Palmer⁶⁴, em 2014, avaliou a utilização de antibióticos relacionando-os com a resistência de microrganismos. A utilização de antibióticos para prevenir infecções tem sido questionada, pois além de poder gerar efeitos colaterais, reações alérgicas e toxicidade, pode levar à resistência microbiana. A maioria das infecções dentárias tem resolução com a remoção do foco, não necessitando intervir com o uso de antibióticos. Há utilização de antibióticos em

odontologia é indicada quando tem o risco de envolvimento sistêmico. Estudos visto pelo autor mostrou que, o uso sistêmico ou local de antimicrobianos em auxílio para tratamentos dentais não apresentam benefícios clínicos. Para tratamentos periodontais o uso de antibióticos ainda precisa de uma melhor investigação. Concluindo assim que, os dentistas devem estar seguros quanto a indicação e utilização de antibióticos.

A revisão de literatura sobre antibacterianos usados em tratamentos endodônticos realizada por Rahimi et al.⁶⁵ em 2014, relata que os microrganismos são os principais fatores que levam às doenças dentárias pulpares e periapicais. Para reduzir esse número de microrganismos, diversas técnicas de irrigação, instrumentação e medicação tem sido sugerida, pois apenas instrumentação mecânica não é suficiente por conta da anatomia pulpar complexa. Para tentar obter um efeito antimicrobiano o estudo relata diversas medicações que tem sido utilizada nos procedimentos clínicos como o hipoclorito de sódio, que tem amplo espectro e eficácia de morte inespecífica em micróbios agindo em espécies como *Enterococcus*, *Actinomyces* e *Candida*, tendo uma vida útil longa. A clorexidina, que é um antimicrobiano de longa duração e atua em bactérias gram-positivas e negativas, incluindo *Enterococcus faecalis*, leveduras e fungos. O iodo iodeto de potássio que é um desinfetante com atividade antimicrobiana de amplo espectro. O MTAD, sendo um antibiótico capaz de eliminar microrganismos resistentes. O hidróxido de cálcio, que tem sua atuação antimicrobiana relacionada com a liberação de íons. A irradiação a laser e terapia fotodinâmica que tem mostrado ter capacidade de limpar e desinfetar até microrganismos mais resistentes como *E. faecalis*, sendo promissora para bactérias patogênicas orais e o ozônio que age contra bactérias, fungos, vírus e protozoários, tendo também capacidade de aumentar a circulação sanguínea regulando positivamente a resposta imunológica.

O estudo de Abouassi et al.⁶⁶ em 2014, teve o intuito de analisar se a atividade da clorexidina, um poderoso antimicrobiano utilizado, altera com os compostos salivares. Para isso, foi utilizada saliva estimulada de 20 voluntários. A estimulação foi realizada com parafina, 2 hrs após o café da manhã. O pH de cada amostra salivar foi medido usando um medidor de pH. A carga bacteriana da saliva fresca foi determinada como uma linha de base. Após a coleta de (12ml) de saliva de cada voluntario a saliva foi dividida em 4 grupos (3 ml/grupo), sendo denominados grupo A, B, C e D. As amostras foram centrifugadas a 4000g em 10 min. Os sobrenadantes nos grupos A e B foram descartados em copos estéreis e usados na formulação com 0,2% de clorexidina. Os sobrenadantes dos grupos C e D foram feitos a mesma coisa, porém no lugar da clorexidina foi colocado solução salina. A atividade da clorexidina foi avaliada após 1 e 3 min. A clorexidina foi desativada pela adição de neutralizador após 1 e 3 minutos. Foi feito plaqueamento com ágar sangue e feita avaliação da UFC/ml. Os resultados obtidos foram que as bactérias anaeróbicas foram significamente reduzidas após 1 minuto de tratamento em comparação a linha de base, assim como as bactérias aeróbicas após 3 minutos de incubação com 0,2%

de clorexidina, se comparados a linha de base. Portanto concluíram que, o efeito da saliva na atividade da clorexidina foi fraco, embora estatisticamente significativo.

Salmazi et al.⁶⁷ em 2015, avaliou a ação antifúngica com a CUR em um sistema precursor de cristal líquido em vagina. Foi utilizado na composição 40% de álcool cetilicopolioxipropileno-polioxietileno, 50% de ácido oleico e 10% de dispersão de quitosana a 0,5% com adição de 16% de poloxamer. A formulação F foi selecionado como precursor de CL e CUR foi adicionado a F, resultando na formulação FC. Ambas formulações foram diluídas em muco vaginal artificial (MAV), sendo a relação 1:3 gerando F30 e FC30 e a 1:1 gerando a F100 e FC 100. Para avaliar a caracterização estrutural das formulações foi colocada 1 gota de formulação em lamina, coberta por uma lamínula, examinada sob luz polarizada em temperatura ambiente. A avaliação da força muco-adesiva foi feita com um teste de descolamento usando um analisador de textura TA-XT Plus. A mucosa e a formulação mantiveram contato por 60 segundos até ser retirada para cima para o contato entre as superfícies serem quebradas. As análises reológicas foram feitas a 37°C +- 0,1°C em triplicata, usando um reômetro de tensão controlada. As propriedades de fluxo foram determinadas com um procedimento controlado de taxa de cisalhamento, variando de 0,01 a 100s⁻¹. A avaliação da atividade antifúngica in vitro foi feita com duas cepas de *C. albicans*, uma padrão e uma clínica que foi isolada de uma paciente com candidíase vulvovaginal. Para o uso, as cepas foram subcultivadas em 2 ml de SDB e incubadas a 37°C por 48h. As leveduras foram transferidas para solução salina tamponada com fosfato estéril e diluídas para padrão 0,5, confirmada com leitura espectrofotométrica a 620nm. Após esse procedimento foi diluída 1:1000 para ser usada. Depois de ser realizado o MIC no experimento, foi feita a colocação de 100ul da solução de CUR e FC em cada poço com o meio de cultura. Anfotericina B e fluconazol foram usados para controle positivo. Os experimentos foram encubados a 37°C durante 48h. Em seguida 20 ul de solução aquosa à 2% com trifluorotetrazólio e incubados à 37°C durante 3 h. As soluções incolores mostraram ausência de microrganismos e as vermelhas crescimento de microrganismos. Os resultados dos autores mostraram que a CUR não alterou o comportamento das formulações e que a CUR incorporada foi melhorada, pois os sistemas líquidos cristalinos têm afinidade pelos lipídios presentes na parede celular dos fungos. Concluindo assim que, a inclusão de polímeros aumentou o poder mucoadesivo. A análise antifúngica mostrou que a formulação com CUR foi 16 vezes mais potente do que a CUR livre. Portanto, indicando que a administração vaginal de CUR é promissora para tratamento de *Candida*.

No trabalho de Amaral et al.⁶⁸ em 2016, os autores realizaram uma revisão literária a respeito dos agentes antimicrobianos inclusos em materiais restauradores, e se os mesmos têm ação contra bactérias cariogênicas. Alguns estudos analisado por eles mostraram que a incorporação de agentes antimicrobianos aos materiais restauradores, inibem o crescimento de *Streptococcus ssp.* e *Lactobacillus* em ambiente laboratorial, porém por mais que os antimicrobianos colocados em materiais restauradores

tenham agido na viabilidade e bactérias cariogênicas em laboratório, a prevenção para a cárie ainda é desconhecida. Diversos estudos foram avaliados por eles, sendo que apenas 1 relatou avaliação prolongada (por 6 meses), os outros avaliaram a ação antimicrobiana por um período inferior à 1 semana. Nenhum artigo selecionado avaliou o efeito anticárie.

Um estudo realizado por Palmer⁶⁹, de 2016, fez uma revisão sobre a resistência dos microrganismos aos antibióticos que os cirurgiões dentistas geralmente prescrevem. No estudo enfatizou que para sanar problemas com infecções dentárias, cirurgiões dentistas fazem a prescrição de antibióticos, porém com a resistência dos microrganismos a esse tratamento, vem a grande preocupação dos genes resistentes poderem se espalhar, outras complicações que podem existir com o uso de antibióticos são reações alérgicas, toxicidades e efeitos colaterais. Relatou também que, existe atualmente um número crescente de mortes por conta de infecções resistentes a antibióticos, e o número vem crescendo cada vez mais. Esse problema tem ocorrido por conta da prescrição inadequada e aumento do consumo. O estudo ressaltou que o uso indiscriminado de antibióticos também tem sido associado ao aumento de infecções por *Clostridium*. E indicou que quando houver prescrito antibiótico, avaliar o paciente 2, 3 dias depois, caso o inchaço e temperatura voltarem ao normal, deve-se suspender o tratamento. Prescrição profilática de antibiótico é indicada para pacientes suscetíveis à infecção por conta de doenças pré-existentes ou por apresentar alto risco. Alguns estudos vistos pelo autor mostraram que o uso de antibióticos no caso de pós-operatórios não tem vantagens para prevenção de infecção se for realizado uma boa assepsia. Concluindo assim que antibióticos devem ser prescritos apenas quando necessário.

No trabalho de Featherstone et al.⁷⁰ em 2018, os autores fizeram uma revisão de literatura de agentes de remineralização e anti-cárie. Segundo as informações relatadas, uma nova filosofia para remineralizar, impedir lesões cavitadas e preservar a saúde e estrutura dentária é avaliar os riscos tendo uma detecção precisa e precoce das lesões de cárie, porém métodos modernos para modificar biofilme e remineralizar a estrutura dentária não serão úteis se não modificarmos o meio reduzindo à exposição aos fatores de risco. Os autores mencionaram que, muitos estudos contendo estratégias para o controle de cárie vem sendo estudado, como o uso de prata, efeito combinado de arginina e flúor, tecnologia de fluoreto estanhoso, um novo peptídeo e o uso de remineralização avançada assistida eletricamente. O grande desafio, porém, é que seja uma forma econômica, acessível e de fácil entrega.

3.2 Patologias Bucais e Microrganismos

No trabalho de Akpan e Morgan⁷¹, em 2011, os autores realizaram uma revisão de literatura sobre a candidose oral. Segundo as informações relatadas, a candidíase é uma infecção oportunista e é causada pelo fungo do tipo levedura, sendo em sua grande maioria espécies de *Candida albicans*. A

C.albicans geralmente está na cavidade oral de pessoas saudáveis, sem causar problemas. Em pacientes imunocomprometidos, uma infecção pode chegar à corrente sanguínea levando à uma infecção grave, podendo levar à morbidade e mortalidade. Os fatores predisponentes incluem extremos de idade, diabetes mellitus, pacientes com HIV/AIDS ou leucemia, uso de inaladores de aerossóis esteroides, antibióticos de amplo espectro, drogas psicotrópicas e pacientes com doenças terminais. Também foi relatado que, a função da glândula salivar prejudicada pode predispor a candidíase. A secreção da saliva provoca um efeito dilucional e remove organismos da mucosa. Proteínas antimicrobianas em saliva como lactoferrina, sialoperoxidase, lisozima, polipeptídeos ricos em histidina e anticorpos anti-candida específicos, interagem com a mucosa oral, evitando o crescimento excessivo de candida. O crescimento de candida na saliva é aumentado pela presença de glicose e sua aderência as células epiteliais orais é reforçada por uma dieta rica em carboidratos. Apontaram também a necessidade da utilização do correto tratamento antifúngico e da possibilidade de tratamentos profiláticos em pacientes com comprometimento imunológico. Os tratamentos relatados foram aqueles baseados em antifúngicos tópicos e sistêmicos.

No trabalho de Samaranayake e Matsubara⁷², em 2016, os autores realizaram uma revisão de literatura sobre o ecossistema oral. Segundo as informações relatadas, o microbioma oral existe suspenso em saliva como organismo de fase planctônica ou ligado a superfícies orais como um biofilme de placa. O desequilíbrio ou a disbiose dentro dos biofilmes da placa leva a acometer doenças bucais como carie e doença periodontal. Relata também que as bactérias são o grupo mais predominante de organismos na cavidade oral, tendo entre 500 a 700 espécies orais. Características físico-químicas como pH, oxigênio, temperatura e outros, influenciam o estabelecimento de microrganismos, criando assim uma microbiota complexa. Apontaram também que foi mostrado recentemente que o microbioma oral é único para cada indivíduo. Indivíduos de diferentes locais do mundo podem apresentar microbiota salivar semelhante, indicando que a espécie hospedeira é o principal determinante do microbioma oral. A flora oral é dinâmica e sua composição muda a medida que a biologia da cavidade oral se altera ao longo do tempo. Algumas horas depois do nascimento do bebe a cavidade oral já é colonizada por microrganismos, sendo a via salivar a principal rota de transmissão.

No trabalho de Larsen e Fiehn⁷³, em 2017, os autores realizaram uma revisão de literatura a respeito das infecções geradas por biofilme dental. Segundo informações obtidas a saliva contém 108 a 109 bactérias por mililitro. De acordo com conhecimento atual visto, bactérias de biofilme são a principal causa de doenças. Os colonizadores iniciais do biofilme são estreptococos orais (primeiramente *Streptococcus mutans*) seguidos de espécies de *Actinomyces*. Estas bactérias também estão presentes na saliva e pode originar da profundidade da língua. Também apontaram que durante o desenvolvimento do biofilme, bactérias são metabolicamente ativas usando principalmente nutrientes da saliva. A

composição do biofilme oral vai variar de diferentes locais na cavidade oral e entre os indivíduos. A doença dentária são raramente causadas por bactérias exógenas, mas principalmente por uma reorganização da estrutura e composição do biofilme que permite espécies bacterianas mais virulentas tornarem-se dominantes. Através de estudos de cultivo isolando bactérias, mostrou associação da doença cárie com bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* juntos com alguns *Lactobacillus*, porém estudos também apontaram que outras bactérias também podem estar associadas à cárie levando à ideia de que o desenvolvimento se dá pelo equilíbrio ecológico existente no biofilme da superfície do dente.

No trabalho de Colombo et al.⁷⁴ em 2017, os pesquisadores avaliaram 136 crianças entre 36 a 60 meses para verificar as diferentes bactérias orais de acordo com a gravidade da cárie. Para isso, foi realizada coleta de saliva não-estimulada em tubos falcon de 50 ml por 5-10 min. A coleta foi realizada 1 h após a ingestão de alimentos, para evitar contaminação. A saliva foi centrifugada a 10000 rpm a 4°C durante 10 min. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para análise futura e o pellet usado para extração de DNA e análise microbiana de qPCR. Os resultados mostram que os níveis de *S. mutans* foram positivos, tendo relação com a baixa escolaridade da mãe e com a mamadeira antes de dormir. Para *S. sobrinus*, foi observada correlação negativa para ajuda do adulto com a escovação dos dentes. A frequência da amamentação teve correlação positiva entre *S. wiggisiae* ou *Bifidobacterium spp.* *S. salivarius* correlacionou-se negativamente com a frequência de amamentação. Os níveis de *S. mutans* aumentaram com a gravidade da cárie. Em contraste, os níveis de *S. salivarius* foram significativamente maiores em CF em comparação com crianças com ECC e S-ECC. Não houve estatística diferença entre os grupos para *S. mitis*, *S. oralis*, *A. naeslundii* ou *Lactobacillus spp.* níveis. Houve correlação positiva entre as espécies bacterianas avaliadas neste estudo. Portanto, concluíram que as espécies *Bifidobacterium*, *Scardoviawiggisiae* e *S. sobrinus*, em associação com o *S. mutans*, estão relacionadas com a severidade das lesões de cáries em crianças.

3.3 Saliva

No trabalho de Couto e Lopes⁷⁵, em 2010, os autores avaliaram o fluxo salivar de adultos saudáveis. Para isso, utilizaram saliva estimulada de 100 pacientes entre 20 e 59 anos. Antes da coleta foi avaliada a condição dentária pelo índice CPO-D. No estudo foi observado que indivíduos com história de cárie possuíam menor fluxo salivar e que na presença de alterações dos padrões salivares alguns microrganismos proliferam de forma exacerbada e utilizam das proteínas salivares para aderir à mucosa, fazendo com que as bactérias colonizem e gerem infecções. Foi observado também que a redução do fluxo salivar não depende da faixa etária.

No trabalho de Dawes et al.⁷⁶ em 2015, os autores realizaram uma revisão de literatura sobre as funções da saliva humana. Segundo as informações obtidas, as funções incluem a manutenção de uma mucosa oral úmida, que é menos suscetível a abrasão, e a remoção de microrganismos, células epiteliais descamadas, leucócitos e restos alimentares para deglutição. Foi relatado também que a saliva age como um tampão para proteger mucosas orais, faríngeas e esofágicas do ácido oralmente ingerido ou do ácido regurgitado do estômago. Para facilitar a eliminação de matérias ácidos da boca, contém na saliva bicarbonato como tampão e ureia. A saliva contém muitos agentes antimicrobianos, antivirais e antifúngicos e ajuda também facilitando a cicatrização de feridas orais. O fluxo médio de saliva não estimulada em pessoas saudáveis está na faixa de 0,3 a 0,4 mL/min, a não estimulada de <0,1 mL/min é considerada hipofunção. O fluxo salivar tem pico no final da tarde e durante o sono é extremamente baixo. Dessa forma, a hora do dia de coleta ou medição da taxa de fluxo deve ser especificada. O estudo também relatou que embora a saliva contenha 99% de água, contém mucinas que são sintetizadas pelas glândulas. As mucinas são glicoproteínas fortemente glicosiladas, elas formam um revestimento em toda a superfície da cavidade oral e atuam como um lubrificante. Essas mucinas fazem parte da película de esmalte adquirida e estão presentes no biofilme. A capacidade lubrificante da saliva pode ser pela combinação de mucinas e proteínas. A saliva é a primeira linha de defesa, fazendo a diluição de qualquer material absorvido. Esses efeitos são melhorados pela ligação as proteínas básicas ricas em prolina e histatina. A saliva desempenha muitos papéis na proteção dentária contra abrasão, atrito, erosão e cáries, pois nela contém substâncias como: cálcio, fosfato e bicarbonato. A saliva contém proteínas e peptídeos que demonstraram ter efeitos antibacterianos, antivirais e antifúngicos, mas como a boca é conhecida por ter cerca de 700 espécies diferentes de microrganismos eles não estão presentes em concentrações suficientes para eliminar os membros da flora oral normal, mas com uma boca higiene oral é possível manter a proporção da flora oral prejudicial em níveis baixos para a manutenção da saúde bucal. Eles podem também impedir infecções sistêmicas e alguns microrganismos patogênicos.

No trabalho de Takeshita et al.⁷⁷ em 2016, os pesquisadores avaliaram a variação do microbioma salivar entre adultos japoneses e condições relacionadas a saúde bucal, sendo associadas ao microbioma salivar. Foram avaliados 2.343 adultos, sendo calculadas as populações bacterianas, a medida de avaliação foi chama de PD. Para essa avaliação foi realizada coleta de saliva, sendo ela estimulada ao mascar chiclete por um período de 2 min. As amostras foram coletadas e armazenadas a -30°C. Posterior a esse procedimento, foi realizada análise de sequenciamento de gene e identificadas as espécies, sendo classificadas como OTUs. As chamadas OTUs correspondiam a espécies bacterianas como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Granulicatella adiacens*, *Neisseria flavescens*, *Rothia mucilaginosa* e *Prevotella melaninogenica*. Houve adição de OTUs, correspondendo a patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*,

Treponema denticola e *Filifactoralocis*, e também patógenos como *Streptococcus mutans*. Na avaliação do estudo sendo dividida entre dois grupos (tipo I e tipo II), houve diferença significativa, sendo o grupo tipo II com voluntários mais jovens, apresentando maior número de dentes presentes, menor experiência de carie, bolsas periodontais mais rasas, menor índice de placa bacteriana e uma menor proporção de indivíduos fumantes. Os resultados mostraram que a idade, experiência de carie e tabagismo, estavam associados com o tipo salivar.

3.4 Inativação Fotodinâmica

No trabalho elaborado por Wilson e Mia⁷⁸, em 1994, os autores avaliaram o efeito da fotossensibilização de *Candida Albicans* in vitro. Para isso utilizaram dois lasers, um Hélio neon (HeNe) gás laser e um gálio de alumínio arsenieto (GaA1As) diodo laser. Na utilização do laser HeNe teve a associação da sensibilização por azul de toluidina, tendo o laser uma potência de 7,3 mW e emitindo a luz com um diâmetro do feixe de 1.3 milímetros em um comprimento de onda de 632.8 nm. Para o laser GaA1As utilizaram como fotossensibilizador o azul de metileno, com a potência do laser de 11 mW, tendo emitido um comprimento de onda de 660 nm, com um diâmetro de 9 milímetros. A *Candida albicans* utilizada foi cultivada em condições aeróbias em caldo (BHI) a 37°C por 18h. Alíquotas de 50 uL de suspensão de levedura no caldo BHI foram utilizadas em placa de 96 poços, sendo o fotossensibilizador adicionado a cada poço referente a cada tratamento, chegando em uma concentração final de 100ug/mL. O tempo de incubação utilizado nos tratamentos foi de 5 min, sendo expostos a luz por 120s, no grupo (Luz+ sensibilizador+). No grupo que foi utilizado (Luz+ sensibilizador-), teve o mesmo tratamento porém sem a utilização do fotossensibilizador. Em outro grupo (Luz- sensibilizador+), foi utilizado o fotossensibilizador porém sem a exposição da luz. Após o tratamento foi realizado diluições seriadas e foram plaqueadas (50µL) em meio ágar Sabouraud dextrose, sendo incubadas por 3 dias a 37°C em condições aeróbias. Nos grupos que tiveram o laser sozinho ou o fotossensibilizador sozinho, obteve pouco efeito na viabilidade. O resultado mostrando a utilização de laser de HeNe (energia, densidade= 66 J/cm²), na presença de 100ug/mL de azul de toluidina teve aumento da morte de *C. albicans* conforme aumentou o tempo de pré-irradiação de 1-3 min, porém o tempo sendo aumentado para 10 min não interferiu no número de leveduras mortas. Para o grupo que utilizou azul de metileno em associação a luz laser GaA1As (dose de energia = 1,2 J; densidade de energia = 1,8 J/cm²), não teve efeito sobre as mortes de *C. albicans* se aumentasse o tempo de pré-irradiação de 2 para 4 min. Portanto, concluíram que *C. albicans* sensibilizados com corante podem ser mortos por luz com laser de baixa potência em condições semelhantes àquelas que seriam encontradas in vivo. O estudo também mostrou que a sensibilização de *C. albicans* pelos corantes utilizados com o tempo de pré-irradiação de 2-3 min é uma consideração importante se a técnica fosse usada in vivo.

No trabalho realizado por Nitzan et al.⁷⁹ em 1998, os pesquisadores avaliaram efeitos fotodinâmicos dos fotossensibilizadores em *Acinetobacter Baumannii*. Para isso, foi utilizada uma cepa multi-resistente a antibióticos. PMNP foi adicionado antes dos fotossensibilizadores e os fotossensibilizadores foram adicionados a cultura quando chegou a uma densidade óptica de 0.1 a 660 nm. As amostras foram irradiadas a 140 mW e os fotossensibilizadores merocianina 540, cloro alumínio ftalocianina, tetra-sulfonatofenilporfina (TPPS) e tetrametilpiridilporfina (TMPyP) foram dissolvidos até chegar a uma concentração de 2,5 mg/mL. Os resultados mostraram que a utilização de fotossensibilização por porfirinas (naturais, semi-sintéticas ou sintéticas) na presença de PMNP, tiveram inibição do crescimento bacteriano. O tratamento com vários outros fotossensibilizadores na presença de PMNP exibiu apenas inibição marginal. O fotossensibilizador catiônico tetra-metilpiridilporfina (TMPyP) não exibiu nenhum efeito fotodinâmico em *A. baumannii* quando iluminado durante seu crescimento em caldo BHI. As bactérias cultivadas em caldo ou suspensas em solução salina e tratadas com TMPyP, resultaram em uma significativa fotoinativação apenas com o sensibilizador, mesmo na ausência de PMNP. O trabalho mostrou também que uma alta concentração das proteínas presentes no BHI ou no soro impede que a TMPyP atue como fotossensibilizador contra *A. baumannii*. A albumina bovina sérica na mesma concentração de proteína impede que o Dp (na presença de PMNP) atue como um fotossensibilizador. O fotossensibilizador aniônico tetra-sulfonatofenilporfina (TPPS4) não apresentou efeito fotodinâmico em meio de alta ou baixa proteína. Portanto, concluíram que apesar da alta resistência de *A. baumannii* aos antibióticos, elas podem ser tratadas com Dp+PMNP ou TMPyP em ambientes que apresentam um baixo teor de proteína. Quando a concentração de proteína for alta, a eficiência dependerá do tipo de proteína presente no meio.

No trabalho elaborado por Lambrechts et al.⁸⁰ em 2005, os autores avaliaram o efeito do plasma sanguíneo e da albumina sérica humana na inativação fotodinâmica de espécies de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Para isso, os microrganismos isolados de paciente com queimadura foram preparados e suspensos em plasma de sangue humano ou HSA. Para a sensibilização foi utilizado uma solução de cloreto de 5-fenil10,15,20-tris (N-metil-4-piridil) -21,23H-porfirina (TriP [4]), sendo preparado com tampão de fosfato de sódio 50 mM, em uma concentração de 1mM (0,78mg/mL). A concentração final de fotossensibilizador foi de 25 IM. A iluminação foi feita com luz branca halógena de 500 W com irradiância de 30mW/cm², para evitar o aquecimento foi utilizado um filtro de água com 1 cm de espessura. Os microrganismos utilizados foram preparados chegando a uma concentração de 10⁸/10⁹ células por mL. Após adição de fotossensibilizador as suspensões foram transferidas para cultura de poliestireno e iluminadas. Para determinar a sobrevivência microbiana foi realizado uma versão modificada das milhas e o método de misra, para realizar esse método suspensões foram diluídas 10 vezes com PBS. Após o procedimento, gotas de cada diluição foram plaqueadas em

ágar isossensitizante e incubadas por 18h em 37°C para *S. Aureus*, *P. Aeruginosae* 48h para *C. Albicans*. Foi feita análise de UFC/mL de amostras antes da iluminação, após a iluminação, na ausência de fotossensibilizador e após incubação com o fotossensibilizador no escuro. Observaram que, os *S. Aureus* foi mais sensível a PDI com fotossensibilizadores suspensos em PBS que *P. Aeruginosa* e *C.albicans*. Quando os microrganismos foram suspensos em plasma sanguíneo humano a sensibilidade a PDI mudou, porém *S.aureus* permaneceu o microrganismo mais sensível. Avaliando os microrganismos suspensos em albumina, a mesma exerceu efeito protetor dependendo da dose de PDI para todos os microrganismos. Concluíram assim que, os microrganismos avaliados podem ser foto inativados usando Trip [4] como fotossensibilizador, porém o grau de efetividade dependerá do fluido de suspensão utilizada.

No trabalho realizado por Dovigo et al.⁸¹ em 2011, os pesquisadores avaliaram a terapia fotodinâmica (PDI) mediada pela curcumina (CUR) contra isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, em formas planctônicas e em biofilme. Para isso, as suspensões de *Candida* tiveram tratamentos com três concentrações de CUR diferentes e expostas a 4 fluências de LED. A CUR utilizada foi preparada em DMSO e diluída em solução salina, chegando as concentrações finais de 5, 10 e 20 μM . A iluminação foi um dispositivo de LED azul com emissão de 440 a 460 nm, tendo uma irradiação média de 22 mW/cm^2 . Alíquotas de 100 μl de *Candida* foram distribuídas em placas com 96 poços e cada grupo passou pelo tratamento proposto. Para o grupo PDI, houve um tempo de incubação de 20 min e após esse período foi realizada iluminação de 5,28, 18, 25,5, e 37,5 J/cm^2 . Para análise da CUR sozinha, o grupo P+L- foram expostos pelas mesmas condições porém sem exposição a iluminação. O efeito da luz também foi avaliado sem a utilização do fármaco, sendo determinado como grupo P-L+. Para o grupo controle a *Candida* não sofreu iluminação nem sensibilização pelo fármaco, sendo determinado grupo P-L-. Após os tratamentos foram realizadas diluições seriadas e plaqueadas em meio SDA, sendo incubadas a 37°C por 48hrs. Em culturas planctônicas houve redução de 4 logs na viabilidade de *C. albicans* e *C. tropicalis* com o uso de 10 μM de CUR em todas as fluências de luz testadas, enquanto que *C. glabrata* precisou de 20 μM de CUR, associado a fluências de luz a partir de 18 J / cm^2 . Para a inativação de biofilmes quando comparado com o controle, a PDI induziu uma diminuição significativa nos valores de espécies de *Candida*. Para isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, o uso de concentrações de CUR de 30 e 40 μM associado a 5,28 J / cm^2 , assim como o uso de 20, 30 e 40 μM a 18 J/cm^2 , promoveu redução semelhante na atividade metabólica dos biofilmes ($P < 0,05$). Portanto, concluíram que baixas concentrações de CUR podem ser altamente efetivas para a inativação de isolados de *Candida* quando associadas à excitação leve.

No trabalho de Dovigo et al.⁸² em 2011, os pesquisadores avaliaram a associação da curcumina com um diodo emissor de luz para a inativação de *Candida albicans*. Para a realização do experimento suspensões de *Candida* foram tratadas com nove concentrações diferentes de curcumina. A curcumina utilizada foi diluída em DMSO a 10% e a fonte de iluminação foi um diodo emissor de luz azul com emissão de 440nm a 460nm, tendo uma irradiação de 22 mW/ cm². O primeiro teste foi para avaliar a concentração de curcumina, para isso foram testadas nove diferentes concentrações 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µm, com uma fluência de iluminação de 37,5 J/cm². O tratamento das concentrações foi realizado com suspensões padronizadas de *Candida* (100µL) e sendo incubadas no escuro por 20 min. Após serem tratadas e realizado diluição seriada, as amostras foram plaqueadas em meio SDA, sendo incubadas a 37°C por 48h. Através dos resultados obtidos as concentrações que tiveram melhores resultados para culturas planctônicas foram 5, 10 e 20 µm, porém com tempos de iluminação diferentes para atingir as fluências propostas. Para tratamento de *Candida* em biofilme as suspensões foram ajustadas a uma densidade óptica de 0,38 a 520 nm. Após a formação dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS para remover as células não aderentes remanescentes. Em seguida, 100 µL de solução de curcumina foram adicionados a cada poço. As concentrações de curcumina testadas foram 5, 10, 20, 30 e 40 µm. As amostras foram incubadas no escuro por 5 e 20 min, seguidas de iluminação de 5,28 J/cm². Para o grupo controle foi utilizado PBS no lugar de curcumina e as amostras não foram iluminadas. Para avaliar os efeitos antifúngicos em biofilme foi feito um ensaio metabólico baseado na redução do XTT. Para a inativação de suspensões de *C. albicans* em comparação com o grupo controle, houve uma redução significativa na viabilidade observada após a PDI e a diminuição nos valores de UFC/mL foi dependente da concentração de curcumina usada. As três concentrações mais elevadas (5, 10 e 20 µm) foram os mais eficazes para o efeito fotodinâmico e a matança completa do microrganismo foi conseguida com a curcumina em 20 µm, com iluminação chegando a 37,5 J/cm². Para a inativação de biofilmes de *Candida* o grupo controle teve uma diminuição estatisticamente significativa na atividade metabólica (teste XTT), isso sendo observado para todas as concentrações de curcumina testadas. Uma relação direta entre concentração de curcumina e viabilidade de biofilme foi notada, conforme aumentava a concentração a viabilidade diminuía. O efeito de redução, porém obteve melhores resultados quando incubados por um período pré-irradiação de 20 min. Através dos resultados obtidos concluíram que a curcumina sendo irradiada por uma fonte de luz LED azul mostrou-se eficaz para a inativação de *C. albicans*, tanto em forma planctônicas quanto em biofilme.

No trabalho de Araújo⁸³, em 2012, os pesquisadores avaliaram a PDI com a curcumina sendo o fotossensibilizador. A fonte de luz utilizada foi um diodo emissor de luz azul à 450 nm. A curcumina utilizada foi dissolvida em água destilada estéril chegando em uma concentração de 1,5 g/L antes do uso. Foram divididos 13 voluntários em três grupos: L-D- (sem luz, sem droga; grupo controle), L-D+

(tratamento apenas com a droga; grupo curcumina) e L+D+ (tratamento com droga e luz; grupo terapia fotodinâmica). Para a análise microbiológica foram feitas coleta de saliva não estimulada (2mL), em dois períodos de tempo diferentes e em três situações diferentes, sendo plaqueadas em ágar sangue e realizado a contagem de UFC/mL. Os resultados mostraram que houve diferença considerável entre os dois grupos experimentais quanto à efetividade da redução bacteriana, tendo o grupo L-D + uma redução bacteriana de 9%, enquanto o grupo L+D+ uma redução de 68%. Portanto concluíram que a PDI pode ser um procedimento utilizado para desinfecção da cavidade oral.

No trabalho de Araújo et al.⁸⁴ em 2012, os pesquisadores avaliaram a redução bacteriana em culturas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. Para isso, foi utilizado a terapia fotodinâmica (PDI) após sensibilização com curcumina (CUR) e exposição à um LED de luz azul. A CUR utilizada foi dissolvida em água destilada estéril, chegando as concentrações de 0,75 e 1,5g/L. A iluminação utilizada teve uma intensidade de 19mW/cm² e um comprimento de onda de 450 nm. Para o tratamento nos microrganismos foram preparadas suspensões bacterianas de *S. mutans* e *L. acidophilus*, sendo formados os seguintes grupos: grupo LD- (sem luz, sem droga), Grupo L-D + (Tratado apenas com fármaco (curcumina), Grupo L + D- (Tratado apenas com luz) e grupo L + D + (tratado com curcumina e luz). Aliquotas de 100ul de cultura foram colocadas em poços com 100ul de solução de curcumina, tendo um tempo de incubação pré-irradiação de 5 min, após incubação as amostras foram iluminadas por 5min. Depois dos tratamentos propostos para cada grupo foram feitas diluições seriadas preparadas em caldo BHI, e as alíquotas de 100 µL foram espalhadas sobre as superfícies das placas ágar-sangue e, em seguida, incubados por 72 h. Os grupos L-D- e L-D + foram mantidos nas placas à temperatura ambiente no escuro, cobertos com folha de alumínio (incubação), ao mesmo tempo que o tempo de irradiação, e o grupo L + D- foi irradiado com luz azul do laser de diodo por 5 min à temperatura ambiente na ausência do fármaco. Os efeitos da PDI sobre as culturas planctônicas de *S. mutans* e *L. acidophilus* mostraram que, o grupo (L+D+) continha um número significativamente menor de bactérias ($p < 0,5$) do que qualquer outro grupo. Reduções de 54% e 91% foram obtidas para 0,75 e 1,5 g/L, respectivamente. As diferenças entre as frações médias de sobrevivência para os demais grupos foram bastante baixas. O efeito de *S. mutans* à curcumina de 0,75 g/L e subsequente iluminação, resultou em uma redução de 68% ($p < 0,5$) de células viáveis. Quando a concentração de curcumina foi de 1,5 g/L, obteve-se uma redução de 100% para a fração de sobrevivência bacteriana ($p < 0,5$). Nas suspensões de *L. acidophilus* com a utilização de 0,75 g/L de curcumina e iluminação, houve uma redução de 21% ($p > 0,5$). Porém quando se utilizou uma concentração maior de curcumina 1,5 g/L, observou-se uma redução maior de 37,6% ($p < 0,5$). Observou-se também que, sem curcumina, a irradiação luminosa isoladamente (L+D-) não afetou a viabilidade dos microrganismos. Portanto, através dos resultados concluíram que *S. mutans* e *L. acidophilus* foram suscetíveis à curcumina na presença de luz azul, mas em uma extensão diferente.

No trabalho de Ribeiro et al.⁸⁵ em 2012, os pesquisadores avaliaram o efeito fotodinâmico da curcumina em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) em comparação com *S. aureus* suscetíveis (MSSA) e fibroblatos L929. Para isso, suspensões de MSSA e MRSA foram tratadas com curcumina em diferentes concentrações e expostas a uma fonte de iluminação. Suspensões de MSSA (100ul) foram colocados em placas de 96 poços e adicionado o fotossensibilizador. As concentrações finais de curcumina utilizadas foram 0,1 0,5 1, 5, 10 e 20 uM. Após incubação por 20 min as suspensões foram submetidas a três fluências de luz (18,0 25,5 e 37,5 J/cm². Para avaliar apenas o efeito da curcumina, suspensões passaram pelo mesmo procedimento, porém sem serem submetidas à fonte de iluminação (C+L-). Para avaliar o efeito da exposição de iluminação, células foram expostas a luz LED, porém sem o contato com a curcumina (C-L+). Amostras expostas à luz com curcumina foram consideradas controle negativo (C-L-). Após o teste com MSSA, as concentrações mais promissoras foram utilizadas contra MRSA. Para determinar a sobrevivência, alíquotas dos experimentos foram diluídas em série, plaqueados e incubados a 37°C por 24h. Depois do tempo de incubação foi realizada a contagem de UFC/ ml. Para os fibroblastos L929, foram colocadas alíquotas de 350 µL de curcumina em concentrações finais de 5, 10 e 20 uM, que mostraram mais resultados com os experimentos anteriores. As amostras passaram pelo mesmo tempo de incubação (20 min), sendo depois iluminadas pela fluência de melhor resultado (37 J/cm²). Os mesmos grupos foram utilizados, porém para avaliar a viabilidade de fibroblastos foi realiza a produção de desidrogenase succínica. Para esse propósito, foi feito ensaio de metiltetrazólio (MTT) e para análise de morfologia foi feito o MEV. Nos resultados foram observados que, as maiores concentrações de curcumina em combinação com qualquer fluência de luz resultou na eliminação completa de MSSA. Para MRSA, a concentração de 20 µM combinada com iluminação de 37,5 J/cm² que obteve inativação completa das suspensões bacterianas. Para as células L929, teve uma diminuição de 68,1% 75,1% e 80% quando expostas a 5, 10 e 20 µM de curcumina com iluminação. Para análise de toxicidade não houve diferença significativa. Para avaliação do MEV o grupo controle e o grupo apenas com curcumina permaneceram aderidos ao substrato. Portanto concluíram que, a utilização da curcumina com a fonte de iluminação LED consegue ser eficiente, principalmente contra bactérias.

No trabalho realizado por Paschoal et al.⁸⁶ em 2013, os pesquisadores avaliaram a eficácia in vitro da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans*, usando como fotossensibilizador a curcumina. Para a iluminação foi utilizado um diodo emissor de luz (LED) azul, com emissão de luz de 400 a 500 nm, tendo intensidade de 240.1 mW/ cm². As fluências testadas no estudo foram de 24, 48 e 72 J/cm². A curcumina utilizada teve 3 diferentes concentrações (2000, 4000 e 8000 µM). Suspensões contendo 500 µL de *Streptococcus mutans* foram transferidas para placas de 24 poços. Os tratamentos foram divididos em 4 grupos, o grupo controle (sem curcumina e sem luz), o grupo

C (com curcumina e sem luz), o grupo L (sem curcumina e com luz) e o grupo PDI (com curcumina e com luz). Após o experimento alíquotas foram plaqueadas em ágar BHI e incubadas a 37°C por 48 h, depois desse período foi feita a contagem de UFC/mL. Os resultados apontaram que, O grupo C + L +, em condições experimentais específicas, demonstrou uma redução bacteriana 70% maior que o grupo CL-. Ambos os grupos C-L + e C + L- apresentaram uma ligeira diminuição na contagem bacteriana de log. Concluindo assim que esse método pode ser capaz de reduzir *S.mutans* em suspensões planctônicas.

No trabalho realizado por Leite et al.⁸⁷ em 2014, os pesquisadores avaliaram desinfecção oral 1 e 2hrs após tratamento com a PDI, tendo utilizado luz azul e curcumina. O laser utilizado foi o laser de diodo (LED) (455+-30nm). Foi aplicada a luz por 5 min, produzindo uma densidade de energia de 200J/cm². A formulação usada foi curcumina (1,5 g/L) em dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1%), diluída em água destilada autoclavada (980 µL) para chegar à concentração de 30mg/L. Os voluntários fizeram bochechos(20mL) com CUR por 5 min, após esse procedimento foi aplicado luz azul por 5 min. Da mesma forma a cavidade oral do grupo da luz foi iluminado por 5 min e o grupo da CUR apenas com bochechos por 5 min. Foi feita coleta de saliva antes do tratamento e após o tratamento (1h e após 2h), as amostras tiveram diluição seriada e alíquotas de 100uL foram cultivadas em ágar sangue por 48h a 36°C, após incubação o número de UFC/mL foi determinado. Os resultados mostraram que, o grupo PDI teve redução de 1 log em UFC/mL no pós tratamento de 1 e 2h, em comparação com o pré-tratamento. Não houve mudanças significativas para o grupo de luz. O grupo da CUR mostrou aumento significativo nas contagens de colônia após 1h, em comparação com o pré-tratamento, tendo caído os valores após 2h. O grupo PDI mostrou diferença significativa em redução de microrganismos se comparado aos grupos de luz e CUR. Concluíram assim que, a utilização de LED azul com a CUR em PDI teve redução de microrganismos salivares que duram 2h, podendo ser um potente desinfetante oral prévia à procedimentos clínicos.

No trabalho de Tonon et al.⁸⁸ em 2015, os pesquisadores avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica, tendo como fotossensibilizador a curcumina, em modelo de suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*. A fonte de iluminação utilizada foi um emissor de luz azul com três fluências diferentes testadas (24, 48 e 72 J/cm²), tendo uma intensidade de 240.1 mW/cm². A curcumina utilizada foi testada em diferentes concentrações (0,75mg/mL, 1,5mg/mL e 3 mg/mL). Os tratamentos foram divididos em 4 grupos, sendo o grupo controle (sem curcumina e sem luz), o grupo C (com curcumina e sem luz), o grupo L (sem curcumina e com luz) e o grupo PDI (com curcumina e com luz). Suspensões de 500 µL de *S. mutans* foram utilizadas e incubadas com o fotossensibilizador 60 segundos antes da iluminação (tempo de pré-irradiação). Após cada tratamento alíquotas foram plaqueadas em ágar BHI, incubadas e feita a realização da contagem de UFC/ml. Os resultados demonstraram que houve uma

redução bacteriana de 70% no grupo PDI, para os grupos C e L ocorreu uma baixa redução bacteriana porém não apresentou toxicidade. Concluíram assim que, a terapia fotodinâmica com a utilização da luz LED azul e a curcumina apresentou efeito antimicrobiano em cepa padrão de *S.mutans* em modelo de suspensão planctônica.

No trabalho elaborado por Santezi et al.⁸⁹ em 2016, foi avaliado a inativação de patógenos usando a terapia fotodinâmica (PDI), curcumóides e luz led. Para isso, foi realizada a coleta de 10mL de saliva não estimulada em tubos falcon de 50 mL. A formulação composta por curcumóides foi filtrada com uma membrana de 0,22 mm antes de sua utilização. Foi utilizado um led azul (440nm +- 10 nm) com lâmpadas (1W) com iluminação simultânea. A potência de uso do led foi de 30 mW/cm², tendo fluência de 1,8 J/cm² e 9 J/cm². Após cada tratamento 100 µL de cada conteúdo foi diluído em série e plaqueado em ágar sangue com a técnica da gota. As placas foram incubadas à 37C por 48h. Portanto, concluíram que todos os grupos tiveram redução significativa no log₁₀ (UFC/mL), se comparado ao grupo controle que utilizou só luz. O uso de 3,0 g/L de formulação com 9,0 J/cm² foi o protocolo de PDT mais efetivo, chegando em uma média de 2,54. O uso de clorexidina em 0,12% por 5 min levou a ausência total de colônias. Quando usado por 1 min, seu efeito foi semelhante ao PDT usando 3,0 g/mL de formulação com 9,0 J/cm² de iluminação. Apenas com o uso da luz não teve efeito significativo.

No estudo realizado por Panhóca et al.⁹⁰ em 2016, os pesquisadores avaliaram a terapia fotodinâmica em pacientes ortodônticos com a utilização de curcumina (CUR) e sulfato de sódio (SDS). Para isso, os voluntários (50) foram distribuídos em 4 grupos: grupo light (só com luz, sem fármaco), grupo PDI (com CUR e luz), grupo PDI + S (CUR + luz + SDS) e o grupo clorexidina (que foi usado apenas CLX). O FS foi preparado com adição de 0,1% de SDS em curcumina de 1 g/L. Para irradiação foi utilizado LED de luz azul (450 – 10 nm), com potência ótica de 200 mW e intensidade de energia de 80 mW/cm². Os dentes e a cavidade oral foram irradiados por 180s, tendo uma dose de energia utilizada de 14 e 85 J/cm². Para os grupos PDI e PDI + S os voluntários fizeram bochecho com o fármaco correspondente por 2 min. Os voluntários do grupo light, bochecho com solução de DMSO 5% durante o mesmo tempo e o grupo CLX foi feito bochechos com clorexidina 0,12% por 30 s. Após os bochechos foram irradiados 360 s (100 J/cm²). A saliva não estimulada foi coletada antes do tratamento, após o bochecho e após tratamento com PDI foi coletada novamente em tubos falcon de 15 mL. Aliquotas de 100 µL de cada amostra foram diluídas em 900 µL de solução salina tamponada com fosfato. Foi feita diluição seriada 10⁵ com a saliva e 25 µL plaqueadas em meio de cultura mitis salivarius, sendo incubados 48h em 37°C e feita a contagem de UFC/mL. Os resultados mostraram que, a redução de *S.mutans* para os grupos de PDI, PDI + S e CLX foram 0,55-0,27, 1,61-0,41 e 3,34-1,66 log₁₀ UFC/mL. Os grupos com maior redução bacteriana foram PDI + S e CLX. Não houve diferença significativa entre

PDI + S e CLX. O estudo concluiu que a CUR com surfactante e luz azul tem potencial de reduzir *S. mutans* em saliva.

No estudo feito por Donato et al.⁹¹ em 2017, os pesquisadores compararam dois fotossensibilizadores (Photogem e CUR natural) na terapia fotodinâmica. Para isso, foram selecionados 50 voluntários, ficando n=5/grupo. Os grupos estudados foram para cada fotossensibilizador, controle de água; controle de FS; controle de luz e 2 concentrações de FS (25 e 100 mg/L). A CUR utilizada tinha a composição de 60% de curcumina e 40% de DMSO à 1%, sendo solubilizado em etanol 99,9%. As soluções finais para teste foram 25 e 100 mg/L em água destilada. O photogem também foi utilizado nessas concentrações, para isso foi adicionado 5 mg/mL de solução estoque. No grupo controle foi feito o bochecho com água destilada. Antes das aplicações de luz os pacientes fizeram 3 bochechos por 1 min com 15 mL de solução contendo FS. Para iluminação da CUR foi usada luz azul na faixa de 450 nm e para Photogem luz vermelha de 630nm com intensidade de 100 W/cm². Para coleta de saliva o paciente cuspiu até um mínimo de 1,0 mL, antes do tratamento, depois e 24h depois. Após coleta das salivas elas sofreram 6 diluições em soro fisiológico e plaqueadas gotas de 25 µL em meio ágar sangue. Depois de incubadas 48h em 37°C foi feita a contagem de UFC/mL. Os resultados mostraram que, além de não ter apresentado efeito tardio o Photogem tem um custo elevado, sendo 4 vezes maior que a curcumina. Concluíram assim que, a CUR a 100 mg/mL com 6 min de iluminação teve maior eficácia, pois apresentou redução de microrganismos após o tratamento e após 24h.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento Experimental

Trata-se de estudo experimental laboratorial no qual diferentes indivíduos forneceram amostras de saliva não estimulada, sendo então as amostras de saliva distribuídas aleatoriamente em diferentes grupos. Como variáveis de desfecho tem-se o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), avaliadas em quatro diferentes meios de cultura para identificação presuntiva de espécies selecionadas. Como variáveis independentes têm-se o tratamento (em três níveis) e formulação (em dois níveis). O cruzamento dessas variáveis deu origem a seis grupos experimentais, os quais estão mostrados no Quadro 1 e serão detalhados mais adiante nesta seção.

Quadro 1 - Grupos experimentais segundo as variáveis independentes avaliadas (Tratamento e Formulação)

Tratamento	Formulação	
	CL	DMSO 10%
PDI (Inativação Fotodinâmica)	PDI-CL	PDI-DMSO
CUR (Apenas Curcumina)	CUR-CL	CUR-DMSO
Controle (Apenas o veículo das formulações)	C-CL	C-DMSO

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Seleção dos Participantes

O protocolo de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da FOAr para apreciação tendo sido autorizado para sua realização (CAAE: 92066218.0.0000.5416) (Anexo A). Além disso, foram asseguradas as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP durante todos os procedimentos da pesquisa.

A forma de amostragem adotada foi a não probabilística composta por um total de 10 alunos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O tamanho amostral foi definido com base em estudos prévios que utilizaram amostras de saliva para avaliações antimicrobianas^{31,32,92,93}.

Para participação na pesquisa, todos os indivíduos passaram por um exame clínico e anamnese e atenderam aos seguintes critérios de inclusão:

- Não apresentar sinais e/ou sintomas de doenças infecciosas na cavidade bucal;
- Apresentar saúde sistêmica (ausência de doenças crônicas);
- Não etilista;
- Não tabagista;

- Não estar grávida;
- Apresentar idade entre 18 e 40;
- Não estar utilizando soluções antimicrobianas ou outras soluções de bochecho há pelo menos 1 mês;
- Não ter feito uso de antibióticos nos últimos 3 meses;
- Não estar utilizando dentífrícios com ação antimicrobiana.

4.3 Aquisição das Amostras de Saliva

Os participantes selecionados foram orientados para não ingerirem alimentos e bebidas, e também para não realizar higiene oral duas horas antes do horário definido para a coleta. Previamente à coleta, o participante realizou um bochecho com 50 mL de água destilada estéril por 30 segundos, a qual foi descartada. Após dez minutos da realização do bochecho, a saliva não estimulada foi coletada em tubos tipo Falcon estéreis (Nest Biotechnology Co. Ltd., China) até se atingir um volume mínimo de 10 mL (Figura 1). O conteúdo salivar de cada participante da pesquisa foi devidamente lacrado e armazenado à 4°C até o momento da aplicação dos tratamentos, que ocorreu em no máximo 2 horas após o procedimento de coleta^{28,94}.

Figura 1 - Tubo falcon contendo a amostra total de 10mL de saliva após coleta



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4 Fotossensibilizadores e Fonte de Luz

A formulação de CUR em CL e DMSO 10% foi preparada sob supervisão do Prof. Dr. Marlus Chorilli, Professor Assistente Doutor do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, que atuou como colaborador dessa pesquisa. A formulação do CL consistiu de CUR (Sigma Aldrich, USA), PPG-5-CETETH-20 (Procetyl® AWS; Croda, Brazil), Carbopol 5% (Lubrizol, Cleveland), Ácido Oleico (Synth, Brazil) e água ultra pura (sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus condutividade 18,2 μ S.cm⁻¹). A formulação de CUR em DMSO 10% consistiu de CUR (Sigma Aldrich, USA), Dimetilsulfóxido 10% (Synth, Diadema/SP) e água ultra pura. A concentração de CUR nas formulações foi de 160 μ M (Figura 2).

A fonte de luz utilizada foi um equipamento com lâmpadas LED denominado de Bio Table, desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos – USP sob a coordenação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. O aparelho possui emissão de luz predominantemente em 460 nm e permitiu a iluminação de todos os orifícios de uma mesma placa de 24 poços de maneira uniforme e simultânea, com potência em 21 mW/cm². A dose de luz avaliada foi 18 J/cm², sendo correspondente a 14 minutos e 17 segundos de iluminação. A concentração de CUR e a dose de luz foram selecionadas tendo como base estudo prévio do nosso grupo de pesquisa⁴³.

Figura 2 - Aspecto das formulações de CUR utilizadas após seu preparo



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.5 Protocolos de Tratamentos e Quantificação Microbiológica

A amostra de saliva total de cada voluntário (10mL) foi agitada em vortex (KMC-1300V, Vortex Mixer) durante 1 minuto para promover sua homogeneização. Em seguida alíquotas de 300 μ l foram assepticamente distribuídas em orifícios de uma placa de 24 poços (Kasvi, China). Foram utilizadas 5 alíquotas de 300 μ l para cada um dos 6 grupos experimentais (cinco replicatas). Em seguida, as amostras

receberam os tratamentos de acordo com o grupo experimental no qual foram alocadas (Quadro 2 e Figura 3).

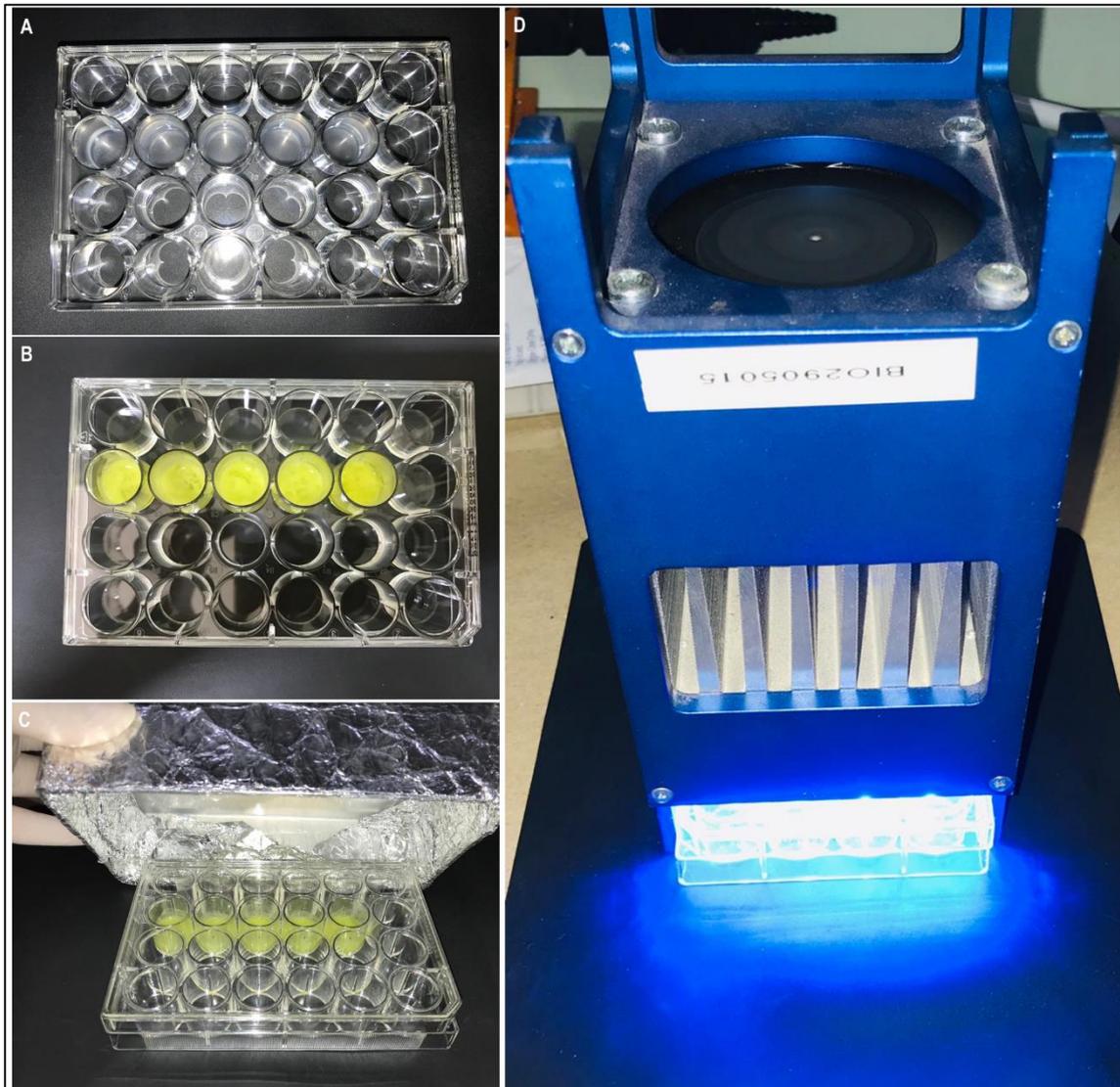
Após os tratamentos, foi realizada a quantificação de células viáveis em cada amostra. Para isso, foram obtidas diluições seriadas a partir do conteúdo de cada orifício/amostra, realizadas com a utilização de microtubos estéreis (Axygen Scientific, México) contendo solução salina (NaCl 9%). As diluições foram semeadas em quatro meios de cultura: Mitis Salivarius (Difco™, France) para identificação presuntiva de streptococcus do grupo mutans, Man, Rogosa e Sharpe (KASVI, Italy) para identificação presuntiva de *L. casei* e outras espécies acidófilas, Chromagar *Candida* (Difco™, France) para identificação presuntiva de *Candida* spp e Müller Hinton (KASVI, Italy) não específico para promover crescimento de microbiota total. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em estufa microbiológica (Estufa bacteriológica TE-392/2, TECNAL), com exceção das placas de Mitis Salivarius que necessitaram de incubação anaeróbica (estufa Co2, LABOVEN). Em seguida a quantidade de colônias foi quantificada (Figura 4) e o número de UFC/mL foi calculado.

Quadro 2 - Detalhamento dos grupos experimentais

GRUPO	DESCRIÇÃO
PDI-CL	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação de CUR (160µM) veiculada em sistema CL. As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft) e a concentração final de CUR atingida na amostra foi de 80µM. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 14 minutos para fotossensibilização. Após esse período, as amostras foram iluminadas por 14 minutos e 17 segundos (18J/cm ²).
PDI-DMSO	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação de CUR (160µM) em DMSO 10%. As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft) e a concentração final de CUR atingida na amostra foi de 80µM. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 14 minutos para fotossensibilização. Após esse período, as amostras foram iluminadas por 14 minutos e 17 segundos (18J/cm ²).
CUR-CL	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação de CUR (160µM) veiculada em sistema CL. As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft) e a concentração final de CUR atingida na amostra foi de 80µM. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por um total de 28 minutos e 17 segundos (14 minutos + 14 minutos e 17 segundos).
CUR-DMSO	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação de CUR (160µM) em DMSO 10%. As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft) e a concentração final de CUR atingida na amostra foi de 80µM. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por um total de 28 minutos e 17 segundos (14 minutos + 14 minutos e 17 segundos).
C-CL	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação vazia de CL (sem CUR). As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft). Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por um total de 28 minutos e 17 segundos (14 minutos + 14 minutos e 17 segundos).
C-DMSO	Em cada alíquota contendo 300µL de saliva, foi adicionado 300µL da formulação vazia de DMSO 10% (sem CUR). As amostras foram homogeneizadas utilizando a ponteira estéril (AXYGEN, México) da micropipeta (MATE soft). Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por um total de 28 minutos e 17 segundos (14 minutos + 14 minutos e 17 segundos).

Fonte: Elaboração própria.

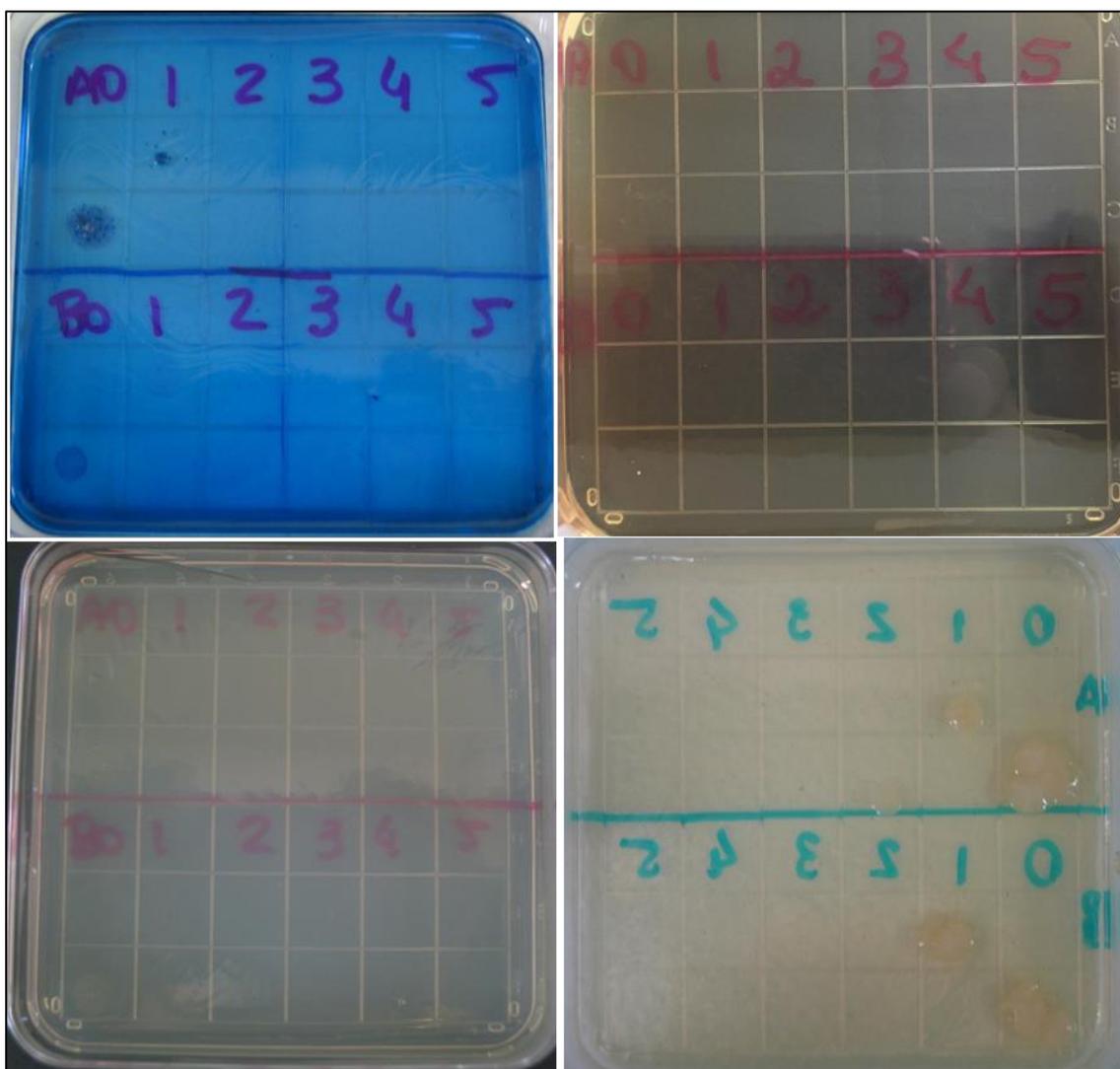
Figura 3 - Imagens de algumas etapas dos protocolos de tratamentos



A: 5 alíquotas de 300 µL de saliva distribuídas nos orifícios de uma placa de 24 poços; B: amostras de saliva expostas a CUR no sistema CL após homogeneização; C: placas sendo cobertas para os períodos de incubação sem luz; D: iluminação das placa com o aparelho Bio Table.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 4 - Imagens das placas com os meios de cultura



A: Mitis Salivarium; B: MRS (Man, Rogosa e Sharpe); C: Chromagar Candida; D: Müller Hinton.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.6 Análise em Microscopia de Fluorescência

Amostras adicionais de saliva dos grupos CUR-CL, CUR-DMSO, C-CL e C-DMSO também foram submetidas à análise em Microscópio de Fluorescência Invertido (Leica DMI3000B) para verificar se a CUR nas formulações testadas estavam sendo liberadas e incorporadas pelas células microbianas após o período de fotossensibilização. Essa análise foi possível uma vez que a CUR possui fluorescência natural na região do verde (488nm) que pode ser observada sem a necessidade de adição de fluoróforos ou sondas.

Para isso, após o período de incubação com as formulações, as amostras foram transferidas para microtubos estéreis para possibilitar centrifugação (5 min/6000 rpm). Em seguida, o sobrenadante

foi coletado e submetido à nova centrifugação (10 min/5042 rpm) para formação do pellet contendo os microrganismos. Em seguida o pellet foi resuspenso em 50 µL de solução salina estéril. Alíquotas foram transferidas para lâminas de vidro (10 µL) que tinham uma camada de ágar para sua estabilização, foram cobertas com lamínula e avaliadas em microscópio de fluorescência com filtros de referência no 488 nm para detecção da curcumina incorporada nas células, assim como foram obtidas imagens no campo claro para visualização total da amostra (células que incorporaram a curcumina *versus* células que não incorporaram). Utilizou-se a objetiva de imersão de 100x. As imagens foram obtidas e processadas pelo software LAS (version 4.4.0). O equipamento utilizado faz parte do laboratório de microbiologia aplicada - Departamento de materiais odontológicos e prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara (FOAr)/UNESP, instalado no 4º andar da FOAr, sob orientação da Dra. Paula Aboud Barbugli (assistente de suporte acadêmico IV).

4.7 Estudo Piloto para Calibração do Pesquisador

Um estudo de reprodutibilidade foi planejado para avaliar a confiabilidade das medidas obtidas para as variáveis em estudo (UFC/mL) previamente à coleta definitiva dos dados. Para isso os mesmos passos descritos anteriormente foram realizados para a coleta de amostra de saliva de um único voluntário (pesquisador principal), diluição da amostra em solução salina e plaqueamento nos diferentes meios de cultura. Foram obtidas 10 duplicatas para cada meio de cultura. Após incubação das placas de Petri (37°C/48h), estas foram colocadas sobre um fundo preto e fotografadas com um celular (Iphone 7, California). O número de colônias foi contabilizado utilizando-se a ferramenta 'Contagem' do programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporate), permitindo que as colônias de uma mesma placa fossem analisadas mais de uma vez. A contagem das colônias foi realizada pelo pesquisador principal em dois momentos distintos (intervalo de 24h), o qual esteve cego em relação à amostra aferida.

4.8 Análise Estatística

Nesta pesquisa, as variáveis de desfecho investigadas foram UFC/mL no meio Chromagar *Candida*, UFC/mL no meio Mitis Salivarius, UFC/mL no meio Man Rogosa Sharpe e UFC/mL no meio Muller Hinton. Duas variáveis independentes foram consideradas: i. tratamento, em três níveis (PDI, CUR, Controle); ii. formulação, em dois níveis (CL e DMSO). Em cada variável de desfecho, os dados foram transformados em logaritmo de base 10 e submetidos à análise descritiva.

Os dados do estudo de reprodutibilidade foram analisados por meio do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI)⁹⁵ considerando-se a concordância absoluta e o modelo de Análise de Variância a dois fatores mistos, para medidas médias, e seu Intervalo de Confiança (IC95%)⁹⁶. Em função do valor de

CCI obtido, o grau de concordância entre os dados foi classificado segundo a proposta de Fermanian (1984)⁹⁷. Neste estudo foi considerado adequado um nível de concordância intraexaminador classificada, no mínimo, como “Boa” ($\geq 0,71$).

Para os dados do estudo definitivo, foi realizado teste de Shapiro-Wilk para verificação do pressuposto de normalidade dos grupos, o qual foi atendido ($p \geq 0,056$) com exceção de apenas um grupo que se mostrou próximo ao limiar de significância ($p = 0,017$). O teste de Levene apontou homocedasticidade em todos os casos ($p \geq 0,147$). Os dados foram submetidos à Análise de Variância a dois fatores (Tratamento e Formulação).

O nível de significância adotado para tomada de decisão foi de 5%. Todas as análises foram realizadas usando o pacote IBM SPSS Statistics (versão 20; IBM Corporation, Nova York, EUA).

5 RESULTADO

Os valores de CCI, obtidos como resultado do estudo piloto de calibração do pesquisador, mostraram adequada reprodutibilidade intra examinador para a contagem das colônias nos quatro meios de cultura utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores pontuais do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e respectivos Intervalos de Confiança (95%) obtidos para reprodutibilidade intra examinador segundo o meio de cultura. Araraquara, 2018

Meio de Cultura	CCI	IC _{95%}		
ChromagarCandida	0,949	0,852	H	0,983
MitisSalivarius	0,997	0,991	H	0,999
Man Rogosa Sharpe	0,944	0,838	H	0,981
Muller Hinton	0,996	0,987	H	0,999

Fonte: Elaboração própria.

As Tabelas 2 e 3 mostram algumas estatísticas descritivas obtidas a partir dos dados dos dez voluntários em cada grupo experimental. É possível observar, pela comparação das médias entre os tratamentos, que a diferença entre elas foi numericamente pequena. Quando a CUR foi avaliada no sistema CL (grupo PDI-CL), obteve-se reduções microbianas médias de 0,03; 0,15; 0,28 e 0,66 log para os meios de cultura Chomagar *Candida*, Mitis Salivarius, Man Rogosa Sharpe e Muller Hinton, respectivamente. Após utilização da CUR em DMSO 10%, atingiram-se reduções de 0,14; 0,61; 0,85 e 0,78 log para os mesmos meios. Nessas tabelas também é possível verificar elevados valores de coeficiente de variação em cada grupo, indicando a alta variabilidade entre os diferentes indivíduos avaliados.

A Figura 5 mostra o comportamento médio em cada meio de cultura. O resultado obtido após as análises inferenciais mostraram que, para os quatro meios de cultura, o efeito dos diferentes tratamentos e formulações sobre o \log_{10} UFC/mL não foi significativo (Tabelas 4 a 7). Esse resultado indica que tanto a PDI como a utilização da CUR isoladamente não promoveram reduções na viabilidade dos microrganismos nas condições de cultivo do presente estudo.

Tabela 2 - Estatísticas Descritivas obtidas dos valores de \log_{10} (UFC/mL) obtidos em diferentes voluntários após avaliação da Curcumina veiculada em sistema precursor de cristal líquido, segundo o meio de cultura e o tratamento. Araraquara, 2018

Estatísticas	ChromagarCandida			MitisSalivarius			Man Rogosa Sharpe			Muller Hinton		
	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle
Média	2,16	2,22	2,20	3,78	4,30	3,93	3,36	3,68	3,64	4,51	5,19	5,18
Mediana	2,18	2,17	2,27	4,14	4,33	3,89	3,31	3,26	3,26	5,03	4,94	5,12
Mínimo	1,19	1,04	1,07	1,78	2,74	2,82	0,87	2,59	2,55	2,34	3,60	3,49
Máximo	2,88	2,92	2,86	5,21	5,42	5,14	5,26	5,33	5,33	6,48	7,16	6,55
Quartil 1	1,80	1,91	1,87	2,81	3,86	3,47	2,37	2,80	2,76	3,18	4,24	4,45
Quartil 3	2,61	2,80	2,70	4,65	4,80	4,26	4,48	4,61	4,57	5,83	6,04	5,92
Desvio Padrão	0,60	0,68	0,59	1,14	0,84	0,71	1,42	1,03	1,12	1,59	1,24	1,00
CV (%)	27,84	30,78	27,01	30,05	19,51	18,08	42,20	27,94	30,63	35,13	23,79	19,26

PDI: Exposição das amostras de saliva a Inativação Fotodinâmica mediada pela Curcumina; CUR: Exposição das amostras de saliva somente a Curcumina; Controle: Exposição das amostras de saliva somente ao veículo utilizado em cada formulação. CV(%): Coeficiente de Variação.

Fonte: Elaboração própria.

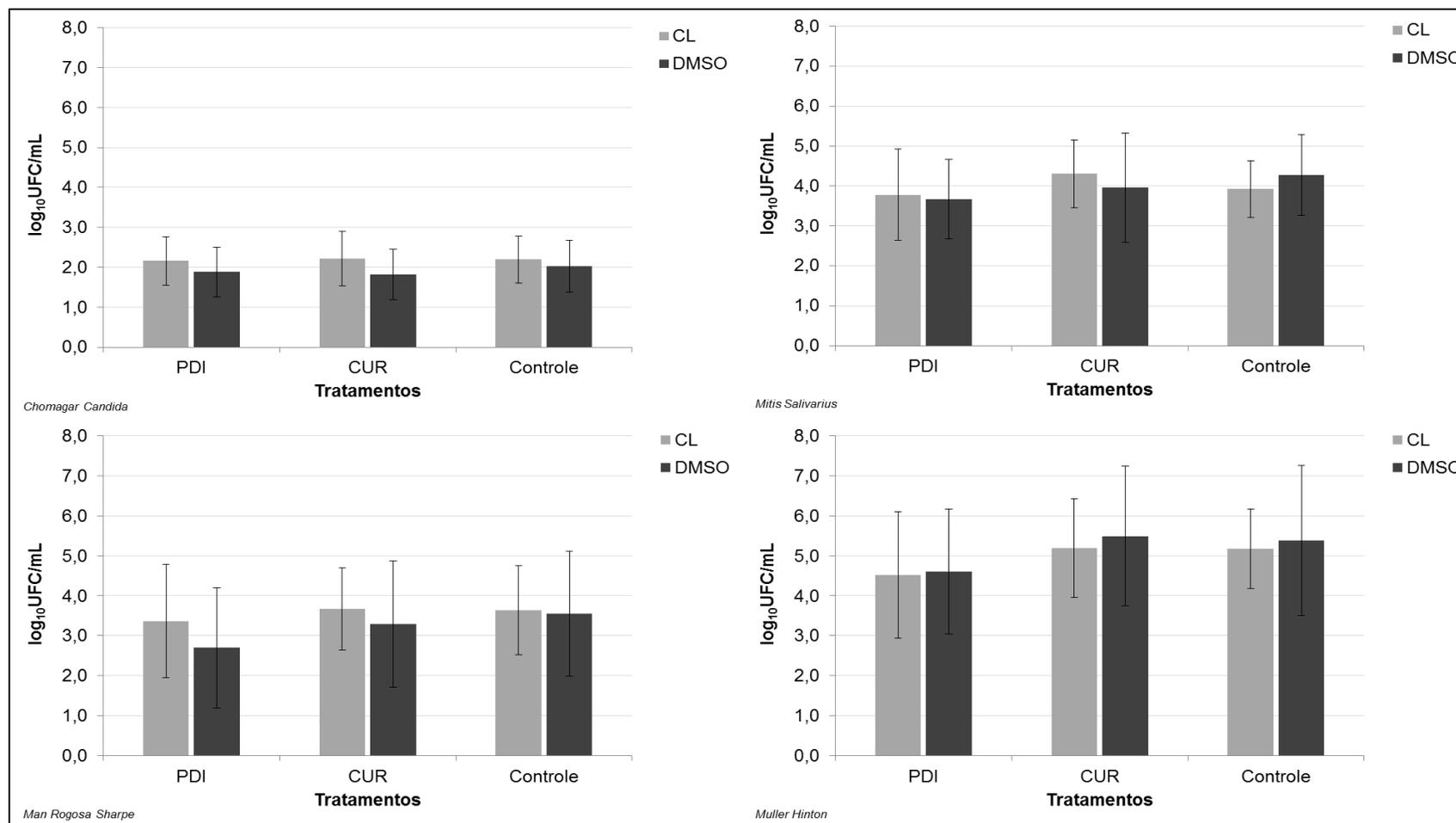
Tabela 3 - Estatísticas Descritivas obtidas dos valores de \log_{10} (UFC/mL) obtidos em diferentes voluntários após avaliação da Curcumina veiculada em DMSO a 10%, segundo o meio de cultura e o tratamento. Araraquara, 2018

Estatísticas	ChomagarCandida			MitisSalivarius			Man Rogosa Sharpe			Muller Hinton		
	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle	PDI	CUR	Controle
Média	1,88	1,82	2,03	3,68	3,96	4,28	2,70	3,29	3,55	4,61	5,49	5,38
Mediana	1,92	1,50	2,08	3,83	4,15	4,30	2,52	3,04	3,55	4,72	5,79	5,92
Mínimo	0,68	1,04	0,81	2,10	1,39	2,88	1,12	1,35	1,63	2,17	2,40	2,14
Máximo	2,85	2,87	2,73	5,19	5,45	5,62	6,04	6,01	6,05	7,65	7,70	7,68
Quartil 1	1,53	1,35	1,73	3,08	2,87	3,42	1,43	2,19	2,50	3,50	4,01	3,95
Quartil 3	2,22	2,37	2,54	4,32	5,07	5,06	3,39	3,85	4,57	5,53	6,75	6,82
Desvio Padrão	0,62	0,63	0,64	1,00	1,36	1,01	1,50	1,59	1,56	1,57	1,74	1,87
CV (%)	32,85	34,54	31,71	27,15	34,41	23,69	55,73	48,26	44,04	34,06	31,72	34,75

PDI: Exposição das amostras de saliva a Inativação Fotodinâmica mediada pela Curcumina; CUR: Exposição das amostras de saliva somente a Curcumina; Controle: Exposição das amostras de saliva somente ao veículo utilizado em cada formulação. CV(%): Coeficiente de Variação.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ segundo tratamento (PDI, CUR e Controle) e formulação (CL e DMSO), nos quatro meios de cultura investigados. Araraquara, 2018.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores para comparação de médias entre grupos da variável \log_{10} UFC/ML segundo tratamento (PDI, CUR e Controle) e formulação (CL e DMSO) para o meio de cultura Chromagar *Candida*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	1,2824	1	1,2824	3,2388	0,0769	0,0512	0,4251
Grupo	0,1188	2	0,0594	0,1501	0,8610	0,0050	0,0721
Formulação x Grupo	0,1420	2	0,0710	0,1794	0,8362	0,0059	0,0766
Erro	23,7572	60	0,3960				
Total	302,9116	66					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores para comparação de médias entre grupos da variável \log_{10} UFC/ML segundo tratamento (PDI, CUR e Controle) e formulação (CL e DMSO) para o meio de cultura Mitis Salivarius. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	0,0173	1	0,0173	0,0163	0,8988	0,0003	0,0518
Grupo	2,2304	2	1,1152	1,0484	0,3568	0,0338	0,2251
Formulação x Grupo	1,3950	2	0,6975	0,6557	0,5227	0,0214	0,1551
Erro	63,8204	60	1,0637				
Total	1117,4717	66					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores para comparação de médias entre grupos da variável \log_{10} UFC/ML segundo tratamento (PDI, CUR e Controle) e formulação (CL e DMSO) para o meio de cultura Man Rogosa Sharpe. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	2,3674	1	2,3674	1,2297	0,2719	0,0201	0,1936
Grupo	3,9365	2	1,9682	1,0224	0,3659	0,0330	0,2203
Formulação x Grupo	0,9029	2	0,4515	0,2345	0,7917	0,0078	0,0851
Erro	115,5098	60	1,9252				
Total	872,2720	66					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores para comparação de médias entre grupos da variável \log_{10} UFC/ML segundo tratamento (PDI, CUR e Controle) e formulação (CL e DMSO) para o meio de cultura Muller Hinton. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.

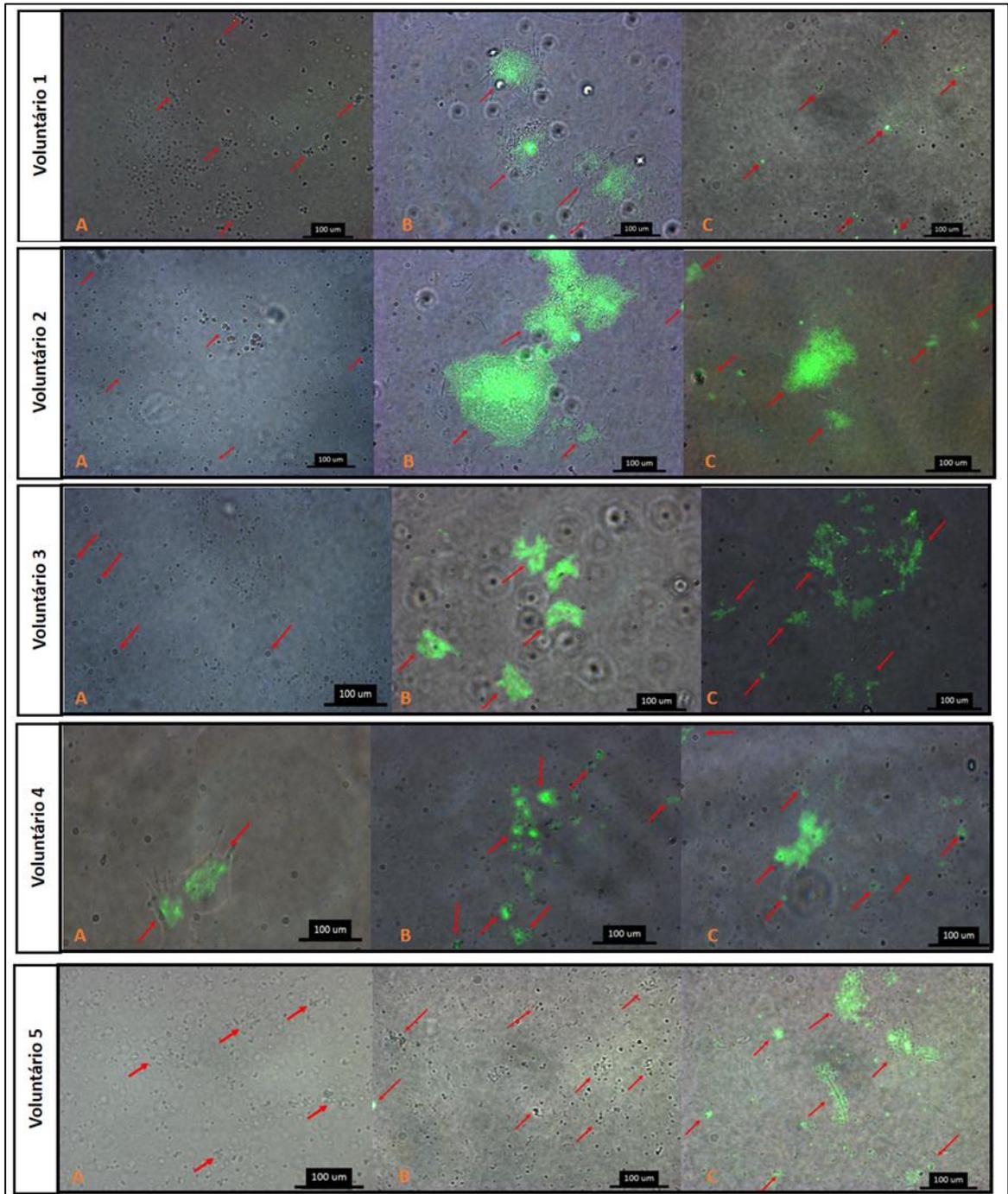
Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	0,6640	1	0,6640	0,2839	0,5961	0,0047	0,0820
Grupo	8,3289	2	4,1645	1,7808	0,1773	0,0560	0,3584
Formulação x Grupo	0,1172	2	0,0586	0,0251	0,9753	0,0008	0,0536
Erro	140,3158	60	2,3386				
Total	1839,6684	66					

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 6 mostra a análise realizada em Microscópio de Fluorescência Invertido com 5 voluntários diferentes da pesquisa, para que por meio dele fosse verificado se a CUR nas formulações testadas estavam sendo liberadas e incorporadas pelas células microbianas, após o período de fotossensibilização. Foi analisado na primeira imagem o tratamento da PDI tendo como fotossensibilizador a curcumina encapsulada (CL), na segunda imagem foi analisado a PDI utilizando como fotossensibilizador a curcumina livre (DMSO 10%) e na terceira imagem foi analisado a curcumina livre sem fonte de iluminação, para que dessa forma pudéssemos avaliar a ação do fármaco apenas. As imagens obtidas foram feitas com a sobreposição de imagens do campo claro e de fluorescência, detalhando assim a incorporação.

Na microscopia podemos observar que onde havia a curcumina encapsulada (CL), não foi detectada fluorescência, significando que não houve incorporação de curcumina por esse tipo de liberação. Por outro lado, na curcumina livre (DMSO 10%), foi possível detectar incorporação nas células.

Figura 6 - Resultados obtidos com a sobreposição do campo claro e com o de fluorescência



A: PDI utilizando curcumina com cristal líquido; B: PDI utilizando curcumina com DMSO 10%; C: Utilização apenas da curcumina em DMSO 10% sendo incubado.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A cavidade bucal é colonizada por bilhões de bactérias, fungos e vírus, os quais constituem o microbioma oral. Esses microrganismos coexistem suspensos na saliva em fase planctônica ou aderidos a superfícies na forma de um biofilme⁹. Características físico-químicas como pH, oxigênio, temperatura e outros, influenciam o estabelecimento dessa microbiota, tornando-a única para cada indivíduo^{9,73}. Estudos de cultivo vêm mostrando a associação de doenças bucais com a presença de bactérias como *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* juntamente com espécies do gênero *Lactobacillus*, e também espécies fúngicas⁷³. Nesse contexto, a descontaminação vem sendo investigada há anos como tratamento pré-operatório da mucosa bucal, por meio da utilização de agentes antibiofilme, contra doenças pulpares ou periapicais^{14,28,63}. A utilização de tratamentos locais também pode auxiliar na redução da prescrição de antibióticos sistêmicos em alguns casos, os quais tem sido fortemente relacionados ao desenvolvimento de resistência^{34,59,69}. A incorporação de agentes antimicrobianos aos materiais restauradores também vem sendo investigada, como meio de inibir o crescimento de *Streptococcus* ssp, *Lactobacillus* e conseqüentemente atuar na prevenção da cárie²¹. Outras formas promissoras de prevenção de cárie têm sido apontadas, como o uso de pré e probióticos e estratégias que fazem a quebra da matriz polissacarídica extracelular de biofilmes com componentes bioativos de liberação de fármacos⁷⁰. Outra tecnologia que vem sendo amplamente estudada é a PDI, a qual se baseia na combinação da luz visível, oxigênio e um fotoantimicrobiano, para assim gerar espécies reativas de oxigênio que levam à morte microbiana³⁶.

O objetivo principal desse estudo foi avaliar a PDI mediada pela CUR em sistema CL contendo ácido oleico para redução microbiana em amostras de saliva humana e especificamente para inativação de espécies identificadas em meios seletivos presuntivos para streptococcus do grupo mutans, *L. casei* e outras espécies acidófilas e *Candida* spp. Os resultados mostraram que tanto a PDI como a utilização da CUR isoladamente não promoveram reduções significativas na viabilidade dos microrganismos nas condições de cultivo do presente estudo. De fato, as reduções microbianas médias obtidas foram de 0,03; 0,15; 0,28 e 0,66 log para os meios de cultura Chomagar *Candida*, Mitis Salivarius, Man Rogosa Sharpe e Muller Hinton, respectivamente. Esse resultado não era esperado uma vez que diversos estudos vêm mostrando a eficácia fotodinâmica da CUR sobre microrganismos bucais^{81,82,84-86, 88,89}, bem como efeito antifúngico da CUR quando incorporada a sistemas CL⁵⁵. Uma possível explicação para esse resultado foi levantada após análise das amostras em microscopia de fluorescência. Não foi detectada presença de CUR nas amostras de saliva, sugerindo que possivelmente o tempo de fotossensibilização utilizado previamente à iluminação pode não ter sido suficiente para possibilitar a liberação da CUR para fora do sistema CL, impedindo que ocorresse a fotossensibilização das amostras.

De fato, o estudo in vitro que verificou efeito da CUR em CL sobre *C. albicans* utilizou um tempo de exposição de 48h das amostras planctônicas ao fármaco e, somente após esse período, é que a viabilidade fúngica foi estimada⁵⁵.

Apesar dessa justificativa, no presente estudo também não se verificou efeito significativo da PDI quando a CUR foi diluída em DMSO 10%. Nessas amostras, foi possível identificar a fluorescência da CUR, indicando que a mesma estava presente nas amostras e mesmo assim não promoveu fotoativação. Esse resultado é contrário ao de muitos estudos prévios encontrados na literatura. Em 2012, Araújo et al⁸⁴. mostraram redução de viabilidade de 99,99% e 37,6% para *S. mutans* e *L. acidophilus*, respectivamente, após o uso de um sal de curcuminoides associado à luz led azul. Outros pesquisadores⁸⁸ também verificaram susceptibilidade in vitro de isolados de *S. mutans* a PDI mediada por um sal de curcuminoides. No entanto, relataram que a redução log obtida para isolados clínicos foi menor em comparação com cepa padrão. Outro estudo também sugeriu que as cepas clínicas são normalmente mais resistentes ao PDI do que as cepas laboratoriais⁸². Estudos anteriores já mostraram também que a eficácia na eliminação de microrganismos é reduzida na saliva em comparação com suas contrapartes planctônicas in vitro^{61,83}, porque a saliva pode funcionar como uma barreira ao efeito antimicrobiano. Tudo isso sugere que a eficácia clínica do PDI depende da capacidade da terapia em eliminar os microrganismos dentro do seu ambiente natural. Outro fato que pode ter sido relevante para os resultados negativos são as concentrações farmacológicas utilizadas, pois um estudo feito por Donato, em 2017,⁹¹ avaliou 2 concentrações diferentes de CUR em saliva (25 e 100 mg/L), e a concentração maior de 100 mg/L, foi que obteve maior redução no número de microrganismos após o tratamento com PDI e após análise de 24h. Outro estudo realizado por Leite, em 2014,⁸⁷ também avaliou a CUR em saliva com uma concentração de 30 mg/L, mesmo com uma concentração baixa o estudo teve redução de 1 log em UFC/mL no pós tratamento de 1 e 2 h. A literatura também já sugeriu em estudo como de Panhóca, em 2016,⁹⁰ que a utilização de fotossensibilizadores com adição de surfactantes pode melhorar o desempenho da PDI para descontaminação oral. No estudo teve a análise de 4 grupos de tratamento (apenas com a utilização da luz azul, a utilização da curcumina com a luz azul, a curcumina com luz azul e surfactante e um grupo com a utilização da clorexidina). Os resultados mostraram que os grupos com maior redução bacteriana contra *S. Mutans* foi o que adicionou surfactantes e o grupo da clorexidina.

A maioria dos estudos in vitro utiliza meio de cultura ou alguma solução tampão para a suspensão microbiana. No entanto, a consistência do meio de suspensão pode influenciar fortemente a eficácia da PDI antimicrobiana⁸⁰. Um dos primeiros estudos que buscou verificar a influência da saliva na PDI mostrou que a mesma teve pouco efeito na taxa de morte obtida com uso de azul de toluidina associado à luz de laser em amostras in vitro de *C. albicans*. No entanto, os autores utilizaram suspensões fúngicas obtidas de forma padronizada in vitro e somente adicionaram saliva humana previamente filtrada, o que

pode ter removido alguns de seus componentes⁷⁸. Já foi mostrado que a presença de proteínas desempenhou efeito protetor dose-dependente na PDI de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*⁸⁰. A proteção mais forte foi observada para *C. albicans* quando suspensa em uma suspensão de 4,5% de albumina (uma redução na contagem viável menor que 1 log₁₀-unidade)⁸⁰. Segundo Nitzan⁷⁹, a natureza das diferentes proteínas no ambiente é fator importante que afeta a capacidade de fotoativação dos fotossensibilizadores. Quando a concentração de proteína é alta, a eficiência da fotoativação depende do tipo de proteína presente no meio, muito provavelmente pela ligação do fotossensibilizador ou pela extinção das espécies reativas de oxigênio formadas⁷⁹. Sabe-se que a saliva humana contém proteínas e peptídeos e que a saliva não estimulada também pode conter glicose, bicarbonato e uréia⁷⁶. Já foi mostrado que a presença de saliva reduz a atividade antibacteriana da clorexidina e pode ser considerado um motivo para aumentar a resistência de algumas bactérias. A saliva humana pode inativar a atividade antibacteriana da clorexidina contra algumas bactérias orais até certo ponto, induzindo processos seletivos nas populações bacterianas de saliva humana³². Portanto, as circunstâncias in vivo, tais como a presença saliva possivelmente tem potencial de interferir na eficácia da PDI antimicrobiana e podem ajudar a compreender a ausência de efeito observada na presente investigação.

Finalmente, é importante ressaltar que nesse estudo as amostras foram coletadas de 10 indivíduos e que uma alta variabilidade entre eles foi verificada. Estudos futuros poderão utilizar um número maior de voluntários no intuito de se entender melhor o efeito que essa variabilidade possui na resposta a PDI, como por exemplo, possíveis características individuais de composição salivar e microbiana que podem ter exercido efeito na resposta microbiológica. As condições orais como dentes presentes, dentes decaídos, bolsas periodontais, sangramento gengival e higiene bucal, junto com tabagismo já foram associadas ao perfil bacteriano salivar¹⁵. Além disso, a utilização de maiores concentrações de CUR bem como um maior tempo de fotossensibilização poderiam ser investigados com o intuito de melhorar a eficácia antimicrobiana, pois um estudo de Wainwright³⁶, em 2017, mostrou que para ocorrer a morte celular pode ser necessário que ocorra a internalização do fármaco, fator esse que pode não ter ocorrido por conta de um tempo inadequado de incubação para a concentração utilizada.

7 CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERENCIAS*

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

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

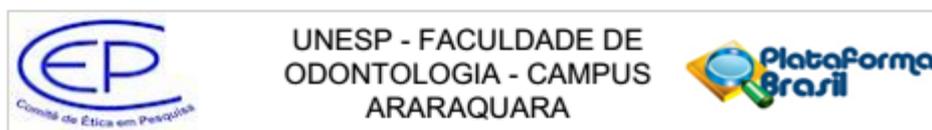
36. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(2): 49-55.
37. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55 :143-66.
38. Rolim JPML,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

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

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

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da FOAr.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO FOTODINÂMICO DA CURCUMINA EM CRISTAL LÍQUIDO SOBRE A VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PRESENTES NA SALIVA

Pesquisador: Livia Nordi Dovigo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 92066218.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.895.906

Apresentação do Projeto:

A Inativação Fotodinâmica (PDI) tem sido investigada em pesquisas para descontaminação e sua ação envolve a interação de uma fonte de luz e de um agente fotossensibilizador (FS). O objetivo deste estudo será avaliar a PDI mediada pela Curcumina em cristal líquido de ácido oleico (CL) para redução microbiana em amostras de saliva humana. Além disso, comparar o efeito fotodinâmico promovido pela CUR (Curcumina), em CL e em DMSO 10%. Amostras de saliva humana não estimulada de diferentes voluntários (n=10) serão coletadas e expostas a diferentes tratamentos (PDI, CUR, Controle) e duas formulações (DMSO 10% e CL), que darão origem a seis grupos experimentais. Serão realizadas diluições seriadas a partir do conteúdo de cada amostra as quais serão semeadas nos meios de cultura Mitis Salivaris, MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e Chromagar Candida, específicos para crescimento de Streptococcus mutans, Lactobacillus casei e espécies de Candida spp, respectivamente. Também será feito crescimento em meio Müller Hinton (não específico). Após incubação a 37°C por 48 horas, o número de ufc/ml será calculado. Serão submetidas também à análise em Microscópio de Fluorescência Confocal, para verificar se a CUR nas formulações testadas são liberadas e incorporadas pelas células microbianas após o período de fotossensibilização. Será realizada análise estatística descritiva e, em seguida, será utilizada Análise de Variância a dois fatores. Para realização da inferência, o nível de significância a ser adotado para tomada de decisão será de 5%.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

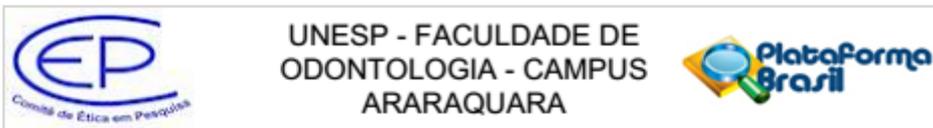
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.895.906

Objetivo da Pesquisa:

Esse estudo pretende investigar o efeito antimicrobiano da PDI utilizando a CUR em um sistema CL sobre amostras de saliva humana. Para isso, irá avaliar a PDI mediada pela CUR em CL de ácido oleico para redução microbiana em amostras de saliva humana e especificamente para inativação *Candida* spp, *S. mutans* e *L. casei* e também vai comparar o efeito fotodinâmico promovido pela CUR em CL e em DMSO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os possíveis riscos e desconfortos sofridos pelo participante da pesquisa se relacionam com a etapa do exame clínico e com a coleta de saliva. Durante a execução dos procedimentos de exame clínico, os participantes da pesquisa utilizarão campo estéril sobre a região do tórax e óculos de proteção de forma a evitar contato de instrumentais com a pele e região ocular. Apesar da coleta da saliva não ser um procedimento invasivo, os possíveis desconfortos serão minimizados da seguinte maneira: a coleta será realizada em ambiente privado (laboratório de pesquisa com agendamento prévio), o participante receberá o recipiente estéril e um guardanapo de papel, será dado tempo suficiente para cuspir o volume necessário e todo o procedimento de coleta será acompanhado por um dos pesquisadores. As informações de todos os participantes serão mantidas em sigilo. Adicionalmente, existem riscos aos pesquisadores que se relacionam com as etapas clínicas e laboratoriais. Durante os procedimentos clínicos, os pesquisadores utilizarão equipamentos de proteção individual (EPIs: jaleco, gorro, máscara, luvas descartáveis e óculos de proteção) na intenção de evitar contaminação direta e cruzada. Durante a fase laboratorial, os pesquisadores tomarão o cuidado de utilizarem os EPIs já descritos acima, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. Todos os materiais manipulados no laboratório de microbiologia serão autoclavados previamente ao seu descarte, conforme normas do laboratório onde se realizará a pesquisa.

Benefícios: Como benefício, os participantes da pesquisa terão um auxílio indireto, já que ao participar dessa pesquisa contribuirão para o aumento no conhecimento de técnicas antimicrobianas alternativas as já atualmente disponíveis, as quais apresentam falhas.

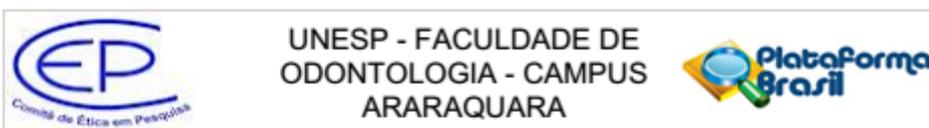
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de maneira satisfatória e justificada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Endereço: HUMAITA 1680	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.895.906

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 14 de Setembro de 2018.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1148201.pdf	19/06/2018 16:38:07		Aceito
Orçamento	11062018.jpg	11/06/2018 16:31:46	Tatiane Miranda Manzoli	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto2.pdf	07/06/2018 16:25:32	Livia Nordi Dovigo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/06/2018 11:01:58	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	06/06/2018 11:00:36	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ressarcimento.pdf	06/06/2018 10:58:08	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_cumprimento_normas.pdf	06/06/2018 10:58:02	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_uso_Lab_Micro.pdf	06/06/2018 10:57:04	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_uso_Lab_DOS.pdf	06/06/2018 10:56:56	Livia Nordi Dovigo	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	06/06/2018 10:52:36	Livia Nordi Dovigo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: HUMAITA 1680
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@oar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.895.906

ARARAQUARA, 14 de Setembro de 2018

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

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

(Direitos de Publicação reservado ao autor)

Araraquara, 08 de março de 2019.

Tatiane Miranda Manzoli