



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

MARISOL PORTO ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIO ORAL
MICROEMULSIONADO CONTENDO CURCUMINA E AVALIAÇÃO DA
SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Vitória da Conquista, BA
2019

MARISOL PORTO ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIO ORAL MICROEMULSIONADO
CONTENDO CURCUMINA E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Francine Cristina Silva Rosa
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr. André Luís Morais Ruela
Universidade Federal de Ouro Preto- UFOP

Vitória da Conquista
2019

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Rocha, Marisol Porto

Desenvolvimento de enxaguatório oral microemulsionado contendo curcumina e avaliação da sua atividade antimicrobiana em terapia fotodinâmica / Marisol Porto Rocha - 2019.

83 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dra. Francine Cristina Silva Rosa

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Morais Ruela

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.

1. Antissépticos Bucais. 2. Periodontite 3. Cárie Dentária. 4. Curcumina. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Rosa, Francine Cristina Silva. III. Ruela, André Luís Morais. IV. Título.

CDU 615.28

MARISOL PORTO ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIO ORAL MICROEMULSIONADO
CONTENDO CURCUMINA E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 17 de Junho de 2019

Profa. Dra. Orientadora Francine Cristina Silva Rosa
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Co-orientador André Luís Morais Ruela
Universidade Federal de Ouro Preto- UFOP

Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada
Universidade de São Paulo

“Dedico este trabalho a Deus que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino. A Nossa Senhora, mãe de Deus e minha mãe pela sua poderosa intercessão e por seu amor! Sem a inspiração divina em cada etapa deste projeto, este sonho não se realizaria.”

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra Francine Cristina Silva Rosa**, minha orientadora e ao **Prof. Dr André Luís Morais Ruela**, meu co-orientador, pela disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanharam a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a grande contribuição para o meu crescimento como pesquisadora. A empolgação de vocês com a ciência me contagiaram!

Agradeço à **Lorena Alves de Oliveira Silva** e **Maiara Prates de Almeida**, colegas de mestrado, pela disponibilidade, acompanhamento e cuidado durante o processo de análise espectrofotométrica e caracterizações físico-químicas, cruciais para o sucesso deste trabalho.

A **Danilo Menezes Oliveira** pelas orientações e acompanhamento das análises reológicas realizadas. Sua paciência em ensinar desinteressadamente tornou tudo mais fácil!

Aos companheiros de laboratório **Gabriel Pinto de Oliveira Santos** e **Ana Meirellen Souza Franca**, pela companhia, troca de informações e vivência no laboratório. Vocês foram cruciais no meu processo de amadurecimento em pesquisa. Sem vocês, este trabalho não teria fluído da mesma forma.

Aos colegas de mestrado por dividir conhecimento, pelo companheirismo, cumplicidade e gargalhadas. Vocês tornaram tudo mais leve! Especialmente À **Bruno Pereira de Araújo**, **Magda Souza Viana** e **Suzete Carvalho Landulfo Luz**, companheiros do grupo de Biofotônica aplicada a saúde (BAS/IMS). O caminho da ciência me apresentou com amigos de uma vida!

Ao **Instituto Muldidisciplinar em Saúde** da Universidade Federal da Bahia, pelo acolhimento e preparo científico.

Ao Grupo de **Biofotônica Aplicada a Saúde**, pela troca de informações que permitiram avanços importantes no desenvolvimento dessa pesquisa e muitas expectativas futuras quanto à sua aplicação.

Ao **Programa de Pós- graduação em Biociências**, pelo conhecimento e experiência adquiridos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pelo apoio e investimento.

Ao **Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica** do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (CEPOF, IFSC-USP) pelo apoio técnico científico e financeiro.

Ao meu irmão **Tiago Porto**, às minhas primas, **Juliana e Rosana**, aos meus amigos **Ana Glória, Evani, Dayane, João Paulo, Robeane e Murilo**. Agradeço a cada um de vocês pela linda amizade, apoio e paciência nas horas que estive ausente. Por toda a dedicação, emanando energias positivas e palavras de apoio nos momentos difíceis. Sem essa injeção de ânimo, não teria a mesma empolgação até o final dessa trajetória.

Aos meus pais **Uilton Silveira Rocha e Teresa Porto Rocha**, por me darem asas para voar e sempre um ninho para pousar. Meu eterno agradecer a cada suor derramado em oferecer a melhor educação a seus filhos. Hoje colho os frutos desta dedicação.

Agradeço a **Deus** e a **Nossa Senhora**, por estarem sempre comigo, me guiando, iluminando cada passo meu. Por me abençoarem com tantos presentes divinos, me dando talvez além do que eu posso merecer. Sem essa força divina, nenhuma conquista seria possível.

Minhas palavras de gratidão a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e que por falha minha não foram citados. Cada palavra, atitude ou gesto me ajudou a subir este degrau. Obrigada.

ROCHA, Marisol Porto. Desenvolvimento de enxaguatório oral microemulsionado contendo curcumina e avaliação da sua atividade antimicrobiana em terapia fotodinâmica. Xf. II. 2019. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

RESUMO

Objetivo: Desenvolver um enxaguatório oral baseado em uma formulação de microemulsão como veículo para o fotossensibilizador (FS) curcumina e avaliar a efetividade *in vitro* do produto desenvolvido, associada à Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (PDT). **Métodos:** Foi construído um diagrama de fase pseudoternário (DFPT) para seleção das potenciais formulações de microemulsão (ME) a serem avaliadas. Foi realizada a caracterização físico-química da ME escolhida por meio de ensaios de tamanho de gotícula, medidas de potencial zeta, pH, densidade relativa e perfil reológico. Foi padronizada metodologia analítica para doseamento da curcumina na formulação desenvolvida por espectrofotometria por UV/Vis. O produto foi submetido a estudo de estabilidade acelerada. Avaliou-se a efetividade *in vitro* da PDT antimicrobiana mediada por LED (Light Emitting Diode) azul (450nm±10nm) de emissão em dois tempos de radiação (10 e 30 minutos) e intensidade de 18 mW/cm² associada à formulação desenvolvida contendo FS curcumina em duas concentrações distintas (30 e 60 µg.mL⁻¹) sobre biofilme de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente (ATCC 33591) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). **Resultados:** O produto final foi definido com a composição de Polietilenoglicol 400, polissorbato 80, óleo de linhaça, sorbitol, água e curcumina. pH de 6,21 ± (0,036), densidade relativa de 1 ±0,0003 g/ml, tamanho de gotículas de 13,86 ± 0,20 nm, índice de polidispersividade igual a 0,151 ± 0,0565, potencial zeta de -10,3 ± 2,6 e comportamento de fluxo newtoniano de baixa viscosidade 1,64 ± 0,01 cP. A formulação final se mostrou estável durante o armazenamento sobre condições forçadas. Houve redução significativa UFC. mL⁻¹ em todos os microrganismos testados (ANOVA 5% e pós-teste de Bonferroni). As maiores reduções de UFC. mL⁻¹ foram de 5,6175 log 10 UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (10') e PDT (30'), ambos com 30 µg.mL⁻¹ em *E. coli*; 5,181 log 10 UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (30') e 30 µg.mL⁻¹ em MRSA; e 3,497 log 10 UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (30'), 60 µg.mL⁻¹ em *C. albicans*. **Conclusão:** O enxaguatório contendo curcumina desenvolvido é fisicamente estável e efetivo *in vitro* na aplicação em PDT antimicrobiana sobre biofilme dos microrganismos testados.

Palavras-chave: diodo emissor de luz; biofilme; curcumina; enxaguatório bucal; microemulsão.

ROCHA, Marisol Porto. Development of oral microemulsion containing oral curcumin and evaluation of its antimicrobial activity in photodynamic therapy. Xf. II. 2019. Dissertation (Master degree) - Multidisciplinary Institute in Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

ABSTRACT

Objective: To develop an oral mouthwash based on a microemulsion formulation as a vehicle for the photosensitizer dye (FS) curcumin and to evaluate the *in vitro* effectiveness of the developed product, associated with antimicrobial Photodynamic Therapy (PDT). **Methods:** A pseudomembrane phase diagram (DFPT) was constructed for the selection of potential microemulsion (ME) formulations to be evaluated. The physico-chemical characterization of the selected ME was carried out by means of droplet size tests, zeta potential measurements, pH, relative density and rheological profile. Analytical methodology was used for the determination of curcumin in the formulation developed by UV / Vis spectrophotometry. The product was subjected to accelerated stability study. The *in vitro* effectiveness of diffusion-emitting diode (450nm±10nm) -mediated (Light Emitting Diode) PDT in two irradiation times (10 and 30 minutes) associated with the developed formulation containing FS curcumin at two distinct concentrations (30 and 60 µg.mL⁻¹) on biofilms of *Candida albicans* (ATCC 90029), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). **Results:** The final product was defined as Polyethylene glycol 400, polysorbate 80, linseed oil, sorbitol, water and curcumin. pH of 6.21 ± 0.036, relative density of 1 ± 0.0003 g / ml, droplet size of 13.86 ± 0.20 nm, polydispersity index equal to 0.151 ± 0.0565, zeta potential of - 10.3 ± 2.6 and Newtonian flow behavior of low viscosity 1.64 ± 0.01 cP. The final formulation was stable during storage under forced conditions. There was significant UFC reduction. mL⁻¹ in all tested microorganisms (ANOVA 5% and Bonferroni post-test). The largest UFC reductions. mL⁻¹ were 5.6175 log 10 CFU.mL⁻¹ in the PDT (10 ') and PDT (30') groups, both with 30 µg.mL⁻¹ in *E. coli*; 5,181 log 10 UFC.mL⁻¹ in the PDT group (30 ') and 30 µg.mL⁻¹ in MRSA; and 3,497 log 10 CFU.mL⁻¹ in the PDT group (30 '), 60 µg.mL⁻¹ in *C. albicans*. **Conclusion:** The curcumin-containing rinse developed is physically stable and effective *in vitro* in the antimicrobial PDT application on biofilm of the tested microorganisms.

Key words: light emitting diode; biofilm; curcumin; mouthwash; microemulsion

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Equilíbrio tautomérico da curcumina.....	19
Figura 2	Tipos e tamanhos típicos de diâmetro de gota das macro, nano e microemulsões, no caso representadas como sistema do tipo óleo-em-água.....	22
Figura 3	Representação esquemática dos sistemas de microemulsão A/O, O/A e estrutura bicontínua.....	24
Figura 4	Enxaguatório desenvolvido após a diluição na proporção 1:5 com água Milli-Q® (Merk, Darmstadt, Alemanha).....	34
Figura 5	Biotable® RGB.....	42

LISTA DE ABREVIÇÕES

%	Porcentagem
®	Marca registrada
LED	Light Emitting Diode
PDT	Terapia Fotodinamica
CPO-D	Dentes 'Cariados, Perdidos e Obturados.
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
HIV/SIDA	Acquired immunodeficiency syndrome
EUA	Estados Unidos
AgNPs	Nanopartículas de prata
FS	fotossensibilizador
$^1\text{O}_2$	Oxigenio singlete
S_0	Estado fundamental
S_1	Estado excitado singlete
T_1	Estado excitado triplete
RH	Compostos orgânicos
ROO^\cdot	Espécies reativas
O_2^-	Anion superóxido
OH^\cdot	Anion radical hidroxila
$^3\text{O}_2^-$	Estado fundamental triplete
Ph	Potencial Hidrogeniônico
CUR	Curcumina
TPI	Tempo de pré- radiação
ME	Microemulsão
A/O	Água em óleo
O/A	Óleo em água
DFPT	Diagrama de fases pseudoternário
%DPR	Desvio padrão reativo
L-C-	Grupo controle
L+C+	Grupo PDT
L-C+	Grupo somente
L+C-	Grupo somente luz
BOD	Demanda Bioquímica de oxigênio
DO	Densidade Optica
BHI	Brain heart infusion
λ_{max}	Compimento de onda de máxima absorção
rpm	Rotação por minuto
μm	Micrometro
$\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
UFC/ mL^{-1}	Unidades formadoras de colônias por mililitro
nm	Nanometro
mV	milivolts

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1.	A CÁRIE E A DOENÇA PERIODONTAL – AFECÇÕES DE IMPORTÂNCIA NA SAÚDE ORAL.....	6
2.2.	CONTROLE DO BIOFILME DENTÁRIO NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS ORAIS.....	7
2.3.	IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIOS ORAIS.....	12
2.4.	NOVIDADES E INOVAÇÕES PARA CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS INTRAORAIS.....	14
2.5.	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (PDT).....	16
2.5.1.	Definição e histórico	16
2.5.2.	Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica	17
2.5.3.	Agente fotossensibilizador	18
2.6.	ENXAGUATÓRIO ORAL MICROEMULSIONADO.....	21
2.6.1.	Microemulsão – conceito	21
2.6.2.	Diagrama de fases pseudoternário (DFPT)	25
2.6.3.	Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta	25
2.6.4.	Aspectos reológicos das microemulsões	27
2.6.5.	Aplicação das microemulsões	28
3.	OBJETIVOS	31
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1.	DELINEAMENTO DA PESQUISA E LOCAL DO ESTUDO.....	32
4.2.	ETAPA 1: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOTÉCNICA DE MICROEMULSÃO PARA INCORPORAÇÃO DO FS CURCUMINA.....	32
4.2.1.	Seleção dos componentes da formulação: Caracterização do ativo e teste de solubilidade	32
4.2.2.	Construção do diagrama de fases pseudoternário (DFPT)	33
4.2.3.	Incorporação da curcumina nas formulações de microemulsão selecionadas	34
4.2.4.	Caracterizações físico-químicas do produto	34

4.2.5.	Avaliação do espectro de absorção da curcumina na formulação desenvolvida.....	35
4.2.6.	Doseamento da curcumina por espectrofotometria no UV.....	36
4.2.7.	Teste de estabilidade acelerada.....	37
4.3.	ETAPA 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PDT MEDIADA PELAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NANOTECNOLÓGICAS CONTENDO CURCUMINA.....	38
4.3.1.	Grupos experimentais.....	38
4.3.2.	Formação dos biofilmes monoespécie.....	39
4.3.3.	Fotossensibilizadores.....	41
4.3.4.	Fonte de luz.....	41
4.3.5.	Condições experimentais.....	42
4.3.6.	Análise estatística da atividade antimicrobina da PDT.....	43
5.	REFERÊNCIAS.....	44
6.	CAPÍTULO - Desenvolvimento e avaliação antimicrobiana de enxaguatório oral microemulsionado contendo curcumina para terapia fotodinâmica intraoral.....	52
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Cárie e doenças periodontais estão entre as doenças crônicas mais comuns no mundo atual. Afeta 60% a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% da população adulta (CARDOSO, 2017). As doenças orais exercem ônus social, econômico e financeiro enorme em uma escala global. A prevalência de periodontite crônica na população geral é aproximadamente 30%. A periodontite generalizada severa está presente 5-15% da população em todo o mundo e é considerada uma das principais causa da perda de dentes (EKE, 2015; AIMETTI, 2015; HOLDE, 2017; GROENEWEGEN, 2018)

No Brasil, a saúde oral é um dos três mais importantes motivos para demanda por cuidados de saúde. As afecções da cavidade oral são doenças relevantes do ponto de vista da saúde pública em função de sua magnitude e transcendência, com reconhecidos impactos sobre a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (ANTUNES et al, 2018; LEE, 2019).

Para uma boa saúde oral, é necessária a remoção eficiente dos biofilmes orais, no entanto, mesmo em pacientes bem orientados, a limpeza adequada de áreas de difícil alcance e da margem gengival é um procedimento que conserva uma série de dificuldades. Escovação e limpeza interdental é especialmente difícil para os pacientes idosos e àqueles com limitações físicas ou mentais, com dentes mal posicionados ou isolados, e ainda para os usuários de aparelhos ortodônticos (SÄLZER, 2015; TAKENAKA, 2019). Isso é mais crítico em indivíduos com condições de risco presentes como pacientes HIV positivos, que realizam tratamento radioquimioterápico, usuários de antidepressivos e os portadores de alguma outra doença de base como diabetes (NITTAYANANTA, 2014; MACHADO, 2014; DE SANCTIS, 2019; MLADENOVIC, 2019). Para esse grupo de indivíduos, muitas vezes, ainda se faz necessária a associação de uma terapia medicamentosa antifúngico-antibiótica e uso de enxaguatórios orais (NOVAES, 2019).

A utilização de enxaguatórios orais como método complementar de higiene oral já é consolidada na Odontologia, pois são de fácil utilização e aceitação, refrescante, expressa bom efeito antimicrobiano, inclusive, atingindo áreas de maior dificuldade (DUDDI, 2014). Os diversos enxaguatórios auxiliam no combate aos microrganismos

causadores de afecções orais como a cárie dentária, placa bacteriana, cálculo dental, gengivite e periodontite e ainda possuem efeito importante no combate à halitose (AL-MAWERI, 2019).

Enxaguatórios contendo gluconato de clorexidina são os produtos mais utilizados como tratamento adjuvante no controle do biofilme dentário causador de doenças orais relevantes como cárie e periodontite. O uso desses tem-se mostrado ser muito eficaz na redução da acumulação de biofilme dentário, sendo considerado padrão ouro para o seu controle (LIZARELLI, 2019; MARKOWITZ, 2019; SILVA, 2019). No entanto, vários efeitos colaterais foram observados com o seu uso, como o manchamento dos dentes e da língua, alteração temporária da percepção do paladar, aumento dos depósitos de cálculo, sensação de queimação e genotoxicidade das células epiteliais intra-orais (OSSO, 2013).

Outro ponto importante é a carência de produtos de higiene oral para pacientes de alto risco e para crianças, que em muitos casos não conseguem realizar bochecho devido a suas condições físicas ou necessitam de cuidadores para realizar a higiene oral (TENT, 2018).

Outro problema dos enxaguatórios é que embora alguns já não utilizem o álcool em sua formulação, muito ainda apresentam como componente na composição. A maioria dos enxaguatórios contém entre 5 e 25% de álcool, que é utilizado para estabilizar e dissolver os ingredientes ativos, proporcionar uma sensação refrescante, aumentar o prazo de validade e prevenir a contaminação por microrganismos (MAEKAWA, 2010). O uso de produtos contendo álcool é desaconselhado em crianças, gestantes, lactantes, diabéticos, etilistas, pacientes que usam metronidazol, pacientes com xerostomia, pacientes com mucosite ou que estejam realizando radioterapia de cabeça e pescoço e pacientes imunocomprometidos (JONESET et al, 2019; LEE et al, 2018; WYGANOWSKA et al, 2018; MAHATTANADUL et al, 2018). Outra preocupação são as reações de hipersensibilidade aos componentes das fórmulas tradicionais devido à necessidade de uso prolongado em alguns casos (MOHAMED et al, 2018).

Além dos efeitos mencionados, o principal e mais impactante efeito colateral do uso dos enxaguatórios e outros tipos de agentes antimicrobianos como antifúngicos e antibióticos na Odontologia é, sem dúvida, a geração de espécies de microrganismos resistentes (HAMBLIN, 2016). Assim, novas perspectivas na utilização de agentes antimicrobianos na Odontologia, se fazem necessárias. Uma

das técnicas antimicrobianas que emergem como condição profilática e/ou terapêutica aos procedimentos convencionais é a Terapia Fotodinâmica (do Inglês, *Photodynamic Therapy* – PDT) Antimicrobiana, que é apontada na literatura nacional e internacional como uma nova e promissora abordagem (AL-MAWERI, 2019; PÉREZ, 2019). Trata-se de um método antimicrobiano de alta eficiência independentemente do status de resistência antibiótica presente (HAMBLIN, 2016).

Embora muitos estudos clínicos e experimentais já tenham comprovada a eficácia da PDT com finalidade antimicrobiana em diversos procedimentos odontológicos como na Endodontia, na Periodontia e na Implantodontia (MOHAMMAD, 2016; BETSY, 2017; SIGRUN, 2017), ainda são raros os estudos que enfatizem a possibilidade do emprego desta técnica para controle do biofilme oral (NEDA, 2018).

A associação da PDT a outra tecnologia, a nanotecnologia, através do desenvolvimento de um enxaguatório microemulsionado pode potencializar a ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica, já que poderá contribuir para que o fotossensibilizador se espalhe e se fixe sobre a mucosa oral, em tempo suficiente para que os microrganismos alvos o absorvam e apresentem sensibilidade à luz (Leite et al, 2014). Além disso, pode aumentar a permeabilidade do fotossensibilizador sobre as barreiras biológicas dos microrganismos, aumentando e tornando mais eficiente a morte microbiana (ROCHA, 2017).

Outras vantagens importantes seriam o aumento da estabilidade do compartimentalizado nas gotículas de óleo, contribuindo para retardar sua auto-oxidação; o aumento da solubilidade do fotossensibilizador no veículo, e a propriedade de mascarar o seu sabor (MASSIMINO e YOSHIOKA, 2014). Isso contribuirá para que se tenha um produto estável e armazenável pronto para uso em consultório sem qualquer prévia preparação, reduzindo o tempo dos procedimentos da PDT.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÁRIE E DOENÇA PERIODONTAL – AFECÇÕES DE IMPORTÂNCIA NA SAÚDE ORAL

A cárie dentária e doenças periodontais exercem ônus social, econômico e financeiro em uma escala global. A prevalência de periodontite crônica na população geral é aproximadamente 30%. A periodontite generalizada severa está presente 5-15% da população em todo o mundo e é considerada uma das principais causas da perda de dentes (EKE, 2015; AIMETTI, 2015; HOLDE, 2017; GROENEWEGEN, 2018). A cárie é reconhecida como uma das doenças crônicas mais comuns no mundo hoje, afetando 60% a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% da população adulta (BAL et al, 2019).

A colonização das superfícies dos dentes por bactérias é um fator etiológico importante nas doenças orais mais comuns - cáries dentárias, gengivite e doenças periodontais destrutivas (SHAH, 2018). Espécies bacterianas orais endógenas, tais como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Streptococcus sobrinus*, e os seus metabolitos têm um papel complexo na iniciação e progressão da cárie dentária (LEE, 2019; YOO, 2019). Infecções odontológicas, porém, podem abrigar até 500 espécies de microrganismos, que podem alcançar a corrente sanguínea e causar algum tipo de bacteremia, levando a uma infecção sistêmica com agravantes em pacientes debilitados (GERMANO 2018; YU, 2019).

Nos últimos 20 anos, pelo menos, tem havido um declínio da cárie e da doença periodontal na maioria dos países industrializados. Esse padrão é resultado de uma série de ações na saúde pública, incluindo o uso eficaz de fluoretos, em conjunto com a mudança de condições de vida, estilos de vida e melhores práticas de autocuidado (CHARLES, 2018; PARKINSON, 2018; SADEQ, 2019). No Brasil isso foi favorecido pela expansão do atendimento odontológico na rede pública, após a implantação do SUS, da Estratégia de Saúde da Família e dos Centros de Especialidades Odontológicas (ANTUNES, 2016). No entanto, as diferenças entre as tecnologias de prevenção disponíveis e a sua plena divulgação e aplicação, também ampliam as desigualdades sociais e étnicas que influenciam as condições de saúde

oral entre diferentes populações (FILHO ET AL, 2014; GROENEWEGEN, 2018; D ASAI, 2018; AL-QADAMI, 2019; AUNG, 2019).

Quanto à prévia presença de patologias sistêmicas, Silva (2018) constatou que a população HIV positiva estudada possui um índice CPO-D de 11,4, classificado como “muito alto” (segundo Ministério da Saúde a classificação do índice CPO-D “muito baixo” é aquela que varia de 0,0 a 1,1; “baixo” que varia de 1,2 a 2,6; “moderado” que varia de 2,7 a 4,4; “alto” que varia de 4,5 a 6,5 e “muito alto” que varia de 6,6 a mais). Groenewegen (2018) avaliou a ocorrência de periodontite em uma população estado unidense e percebeu que a prevalência e severidade da doença são maiores nos pacientes com infecção por HIV em comparação com controles, particularmente em homens. Esse e outros estudos demonstram a baixa condição de saúde oral em grupos populacionais específicos (FILHO et al, 2014; DURAN 2018; LEE, 2019; SILVA, 2018).

Nesse contexto, é de suma importância a prevenção eficaz da cárie e de possíveis doenças periodontais, principalmente na população de alto risco: imunocomprometidos, pacientes hospitalizados ou com doenças de base como diabetes (ARAÚJO et al, 2016). Esse controle pode ser conseguido por uma variedade de métodos que melhoram o nível de higiene oral (SPREADBOROUGH, 2016; LIZARELLI, 2017; LEE, 2019). A remoção mecânica da placa bacteriana através de escovação e uso de fio dental, além do tratamento odontológico como a remoção do cálculo dental e polimento é amplamente utilizada. Porém, devido à dificuldade de tratamento nesse grupo de pacientes, muitas vezes se faz necessária a realização de cirurgias de acesso ou cirurgias regenerativas para recuperar o tecido periodontal, além da associação de medicações antimicrobianas (ZAURA e TWETMAN, 2019; MARKOWITZ, 2019).

2.2 CONTROLE DO BIOFILME DENTÁRIO NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS ORAIS

Biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização, onde os microrganismos possuem estruturação física e coordenação metabólica. As

células encontram-se ligadas umas às outras, envolvidas por uma matriz extracelular de natureza polimérica produzida por elas. Essa matriz apresenta canais, por onde atravessam fluídos contendo nutrientes, metabólitos secretados, enzimas, oxigênio, sais e compostos orgânicos. A associação das células em biofilmes constitui uma forma vantajosa de desenvolvimento que permite benefícios reprodutivos e metabólicos, além de defensivos aos outros organismos, às substâncias antimicrobianas e à defesa do hospedeiro (DENTINO et al., 2013; JOIA, 2017). O biofilme oral tem importante papel na etiologia das doenças que acometem a cavidade oral, apresentando grandes implicações para a qualidade de vida e repercussões na saúde sistêmica (JOIA, 2017).

O principal mecanismo de controle de biofilme oral são os métodos de higiene oral e a remoção mecânica do biofilme, porém, não são eficazes sozinhos em todos os indivíduos, visto que nos pacientes, mesmo bem orientados, a limpeza adequada de todas as áreas intra-orais é dificultosa visto que as bactérias formadoras de biofilme oral também podem ser detectadas na mucosa oral, na língua e nas amígdalas além de se alojarem em bolsas periodontais, sulcos, furcas e concavidades orais (SORO et al, 2014). Escovação e limpeza interdental é especialmente difícil para os pacientes idosos com limitações físicas ou mentais, crianças, indivíduos com dentes mal posicionados ou isolados, ou com aparelhos ortodônticos (SÄLZER, 2015; TAKENAKA, 2019). Isso é ainda mais crítico em indivíduos com condições de risco presentes como pacientes HIV positivos, sobre tratamento radioquimioterápico e antidepressivos ou portadores de alguma outra doença de base como diabetes (NITTAYANANTA, 2014; MACHADO, 2014; DE SANCTIS, 2019; MLADENOVIC, 2019).

O mesmo ocorre com pacientes hospitalizados e em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). A dificuldade de locomoção, condição de saúde debilitada, especialmente aqueles submetidos à ventilação mecânica, favorece a um controle de biofilme oral deficiente (SACHDEV, 2013). Souza (2017) identificou uma alta prevalência de patógenos respiratórios, tais como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp em saliva e biofilme dental nos pacientes hospitalizados. Níveis significativos de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* também foram encontrados no biofilme de pacientes de UTI. O biofilme oral pode conter microrganismos altamente resistentes a antibióticos e agentes

patógenos pulmonares, promovendo um ambiente ideal para o seu crescimento e desenvolvimento, o que facilita a colonização das vias aéreas inferiores, bem como a colonização por bactérias originadas da cavidade oral (SILVA, 2016; PORTO, 2016).

Diante do exposto, a supressão de microrganismos patógenos orais nesse grupo de indivíduos é um requisito importante para a prevenção da recorrência da doença após o tratamento (FILHO, 2014; MEGALAA, 2018; ANTUNES, 2018; PARKINSON, 2019). Para tanto, em tais casos, a utilização de enxaguatórios com antimicrobianos em conjunto com os métodos mecânicos de higiene oral é recomendável (DEHGHANI, 2019). O uso de enxaguatórios orais contendo antimicrobianos altera a formação da placa bacteriana pela inibição do crescimento, metabolismo e a colonização de microrganismos (SILVA, 2019).

Além da cárie e periodontite ocasionada por uma higiene oral deficiente, existe ainda uma ampla variedade de lesões orais que acometem pacientes em tratamentos especiais e doenças de base. É o caso de pacientes HIV positivos e oncológicos. O sistema imunológico comprometido, afeta demasiadamente a saúde oral que acaba por repercutir em outros sistemas orgânicos debilitando ainda mais o indivíduo e comprometendo sua saúde geral (JIANG, 2017; JEHN, 2019; GROENEWEGEN, 2019). O controle mecânico, químico ou medicamentoso do biofilme intra-oral pode ser muito difícil, ineficaz e desestimulante (FILINA, 2019). Esses pacientes expressam condições particulares que aumentam a virulência dos patógenos dos biofilmes microbianos intra-orais contribuindo para a dificuldade de manutenção e controle desses biofilmes, como por exemplo, ter uma alimentação rica em ingestão de sacarose, associada a uma higiene oral inadequada, fazer uso de medicações que diminuem o fluxo salivar (xerostomia) e conseqüentemente, favorecem a multiplicação dos biofilmes intra-orais (PETRUZZI, 2014; SILVA, 2018).

Nesse contexto, alguns microrganismos são importantes causadores de patologias em cavidades orais e insucesso em tratamentos odontológicos. Entre eles estão o *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* metilina resistente e *Cândida albicans*. Estes dois últimos são algumas das principais espécies microbianas facultativas e resistentes da cavidade oral causadora de falhas no tratamento do canal radicular (NIRUPAMA, 2014). Além disso, existem relatos do *Staphylococcus aureus* como agente etiológico de várias infecções endodônticas, osteomielite mandibular e mucosite em idosos dependentes de nutrição parenteral

(SMITH, 2001). Pinto (2013) relata a importância do controle de placa bacteriana e do tratamento das cáries dentárias e doenças periodontais na redução significativa da presença de *Staphylococcus aureus* na cavidade oral, diminuindo, assim, a incidência de pneumonia aspirativa. O *Streptococcus mutans*, por sua vez, tem sido foco de vários estudos desde que foi descoberto o seu potencial de indução de cárie, demonstrada em modelos animais (NASCIMENTO, 2015).

A candidose oral também é uma patologia importante da cavidade oral. É um problema comum, causado pela *Cândida albicans*, que se instala como uma infecção crônica sem evoluir para grave envolvimento sistêmico, porém existe essa grande preocupação quando se trata de pacientes imunocomprometidos (MARINHO, 2016).

Em pacientes portadores de HIV/AIDS a candidíase oral e orofaríngea pode ser uma fonte frequente e significativa de desconforto oral, dor, perda de paladar, e aversão à comida. Para alguns pacientes com HIV/SIDA, a candidíase oral também pode levar a complicações secundárias altamente significativas, como candidíase esofágica e desnutrição (FILINA, 2018; D ASAI, 2018; GROENEWEGEN, 2019). Patton e colaboradores (2014) relataram que o custo anual médio do uso de fluconazol (dose de 200mg) como profilaxia antifúngica por paciente HIV/AIDS por dia, gera um custo anual, nos EUA de \$ 4.267 dólares.

Devido à possibilidade de simbiose entre os microrganismos que habitam a cavidade oral, é possível encontrar todas as espécies em uma mesma microbiota. Nirupama (2014) realizou o isolamento e identificação de bactérias patogênicas na cavidade oral de pacientes com dentaduras removíveis e detectou presença significativa de espécies de *Escherichia coli*. Alvares (2014) salienta a presença da *Escherichia coli* em canais repetidamente abertos e fechados, de pacientes submetidos a tratamentos inadequados, incluindo antibioticoterapia incorreta, mostrando que a *Escherichia coli* pode ser um importante causador de infecções secundárias.

Além dos microrganismos citados, existe ainda a presença de outras espécies emergentes, principalmente em pacientes em tratamento multidroga. Rocha e colaboradores (2006) observaram a presença de enterobactérias representadas por *Enterobacter cloacae* em 60,71% dos indivíduos infectados pelo HIV e *Pseudomonas aeruginosa* em nove indivíduos estudados. Um achado preocupante

visto que este último é um microrganismo virulento que carrega genes de resistência antimicrobiana e está associado a inúmeras infecções de alta relevância nos indivíduos imunocomprometidos.

Ainda em relação aos pacientes de alto risco, Monti e colaboradores (2014) abordou a presença de espécies microbianas frequentes no ambiente subgengival de pacientes HIV positivos e que são incomuns em indivíduos saudáveis, tais como *Enterobacter faecalis*, *Clostridium clostriiforme*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*. Muitos desses microrganismos são superinfectantes e frequentemente se apresentam como responsáveis pela resistência aos antimicrobianos amplamente utilizados na Medicina e Odontologia (MONTI et al, 2014; SEBASTIAN et al, 2019).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos orais têm se mostrado um fator relevante para a seleção de microrganismos altamente resistentes a antibióticos que podem gerar complicações sistêmicas severas. Tent (2019) identificou que as infecções de cabeça e pescoço supurativa de origem odontogênica são os tipos mais frequentes de infecções de cabeça e pescoço, sendo que 7-10% de todos os antibióticos atualmente prescritos para o seu tratamento foram ineficientes devido à resistência microbiana. Na ausência de tratamento adequado e na presença de microrganismos multiresistentes, o processo infeccioso pode se estender rapidamente ao longo da face cervical, dos espaços fasciais laterais da cervical, mediastinal, pulmão ou cérebro e pode evoluir para falência de múltiplos órgãos, choque séptico-tóxico e morte (DEANGELIS et al, 2014; SHAH et al. 2016; HEIM N et al. 2017; TENT et al. 2018; TENT, 2019). Sebastian e colaboradores (2019) avaliou a sensibilidade de antibióticos em infecções de origem odontogênica e evidenciou que a amoxicilina foi o fármaco mais comumente utilizado em todos os casos e obteve a maior resistência (96,55%) para todos os microrganismos.

Diante do exposto, apesar de ser interessante o emprego da profilaxia antifúngica e antibiótica nos pacientes de alto risco, o principal e mais impactante efeito colateral do uso desses agentes é, sem dúvida, a geração de espécies de microrganismos resistentes (HAMBLIN, 2016; SILVA, 2018; FILINA, 2018; GROENEWEGEN, 2019). A perspectiva de descobrir novas classes de antibióticos é considerada bastante baixa, embora melhorias incrementais ainda estejam sendo feitas (CZAPLEWSKI, 2016; DRAENERT, 2015). Em alguns países, os níveis de

resistência são superiores a 25%, e estudo recente indica que cerca de 25 000 pacientes morrem anualmente nos Estados Unidos a partir de uma infecção com bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) (GIACOBBE, 2018). Segundo Cole (2014), na Europa, além de mortalidade, as infecções bacterianas resistentes custam € 1,5 bilhões por ano com relação à saúde extra e perdas de produtividade.

2.3 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE ENXAGUATÓRIOS ORAIS.

A utilização de agentes de controle químico deve complementar a escovação dentária, nos casos em que se verificam dificuldades no controle do biofilme (RAMOS et al, 2014). Os enxaguatórios orais com ação antimicrobiana são adjuvantes na manutenção da higiene oral, contribuindo para a redução do número de microrganismos patogênicos (BALTZER, 2014; RABIN, 2015; DEHGhani, 2019).

Os enxaguatórios orais são a forma mais simples para veiculação de substâncias antissépticas, sendo uma mistura de componente ativo (antimicrobiano), água, eventualmente álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (DEHGhani, 2019; KERDAR, 2019). Os agentes químicos para higienização oral, além de servirem como veículo aos agentes terapêuticos, também devem colaborar para remoção de manchas e controle da halitose (SUZUKI, 2019; BICAK, 2018).

Atualmente a utilização de bochechos com fluoreto de sódio é utilizada como tratamento adjuvante no controle da cárie e periodontite. Estes são eficazes na redução da cárie por inibir os microrganismos orais que utilizam os hidratos de carbono, bloqueando as enzimas que estão envolvidas na via glicolítica bacteriana (GAO et al, 2019; SILVA et al, 2019). Enxaguatórios contendo gluconato de clorexidina, também são utilizados e é considerado o suplemento mais popular e eficiente para intervenção química durante a gestão da gengivite. Tem-se provado ser muito eficaz na redução da acumulação de biofilme dentário, sendo considerado padrão ouro para o seu controle (LIZARELLI, 2019; MARKOWITZ, 2019; SILVA, 2019).

Um fator importante a ser considerado com relação aos efeitos dos enxaguatórios orais é que, os produtos, principalmente a base de clorexidina, são eficazes para redução de biofilme e inflamação gengival, no entanto, um número de efeitos secundários foi observado com o uso em longo prazo (TWETMAN, 2016; HAYDARI, 2017). Os efeitos incluem manchas nos dentes e língua, alteração temporária na percepção do sabor, um aumento em depósitos de cálculo, sensação de queimadura e genotoxicidade de células epiteliais orais (OSSO, 2013; ALMAWARI, 2019). Por estas razões, este agente antimicrobiano é indicado em situações clínicas específicas por curtos períodos de tempo. Concentrações baixas de clorexidina (0,05% ou 0,06%) é atualmente comercializado para o uso diário de longa duração (JAMES, 2017). No entanto, ainda há falta de evidência sobre os efeitos antibiofilme dental e anti-gengivite e quaisquer efeitos adversos associados com seu uso. (MUSTAFA, 2019; TAKENAKA, 2019).

Outro fator preocupante é a resistência microbiana com relação às soluções antimicrobianas tradicionais (STANEVICIUTE, 2019). O uso dessas soluções deve ser orientado pelo profissional de saúde oral, uma vez que o uso indiscriminado destes produtos pode contribuir para um desequilíbrio ecológico da microbiota oral e desenvolvimento de resistência microbiana frente aos agentes utilizados (BARBOSA et al, 2019; TAKENAKA, 2019).

Outro ponto importante é a necessidade de desenvolvimento de novos produtos para pacientes de alto risco. A disponibilidade de enxaguatórios orais contendo diferentes ingredientes ativos – como óleos essenciais, clorexidina e cloreto de cetilperidíneo – é grande. A maioria dos enxaguatórios contém entre 5 e 25% de álcool, que é utilizado para estabilizar e dissolver os ingredientes ativos, proporcionar uma sensação refrescante, aumentar o prazo de validade e prevenir a contaminação por microrganismos (MAEKAWA, 2010).

No entanto, algumas preocupações têm sido levantadas acerca dos possíveis efeitos colaterais na cavidade oral devido ao uso prolongado de enxaguatórios contendo álcool (LEE et al, 2018; WYGANOWSKA et al, 2018; MAHATTANADUL et al, 2018). O uso desses produtos é desaconselhado em crianças, gestantes, lactantes, diabéticos, alcoólicos, pacientes que usam metronidazol, pacientes com xerostomia, membros de algumas religiões, pacientes com mucosite ou que estão submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço e pacientes imunocomprometidos. Alguns destes quadros são condições predisponentes para o aparecimento de

candidoses (JONES et al, 2019). Outra preocupação são as reações de hipersensibilidade aos componentes das fórmulas tradicionais devido à necessidade de uso prolongado dos mesmos nesses pacientes como já foi relatado em relação ao uso da clorexidina (MOHAMED et al, 2018).

2.4 NOVIDADES E INOVAÇÕES PARA CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS INTRAORAIS.

Nos últimos anos houve um aumento das tentativas de desenvolver agentes antimicrobianos ideais a fim de contrapor o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos (BALTZER, 2014). A abordagem antibiofilme ideal é facilitar a dispersão de biofilmes formados, eliminar patógenos e inibir a formação de novos biofilmes, evitando a eliminação de microrganismos comensais que possam causar disbiose microecológica (RABIN, 2015; WUET et al, 2015; GAO, 2017). Diferente dos antibióticos convencionais, como a clorexidina, algumas das novas estratégias de tratamento para infecções por biofilme visam especificamente direcionar características únicas dos mesmos a fim de minimizar ou eliminar a resistência do biofilme oral às drogas (KUANG, 2018).

Novas estratégias vêm sendo criadas ou inovadas para a ruptura e/ou inibição do biofilme oral com menores efeitos adversos, incluindo nanomateriais, sais de amônio quaternário, pequenas moléculas de arginina e os produtos naturais (HEMEG, 2017; LIANG, 2017; KUANG, 2018).

Dentre as últimas inovações na área de saúde oral, destaca-se a nanotecnologia. Nanomateriais, como prata, óxido de cobre, nanopartículas de óxido de zinco, óxido de titânio e grafeno, podem ser usados para controlar a formação de biofilme (ALLAKER, 2014; BESINIS, 2015; HEMEG, 2017); Polietilenoimina de amônio quaternário, quitosana e nanopartículas de sílica também têm sido sugeridas como eficazes no controle de biofilme (BESINIS, 2015; KUANG, 2018).

Certos nanomateriais metálicos possuem alta capacidade de controle do biofilme oral. Entre eles, o nitrato de prata e as nanopartículas de prata (AgNPs) são os mais eficazes contra patógenos orais (BESINIS, 2014). Panpaliya (2019) verificou que nanopartículas de prata exibiam melhor efeito bacteriostático e bactericida, com

uma concentração cinco vezes menor em comparação com a clorexidina. No entanto a descoloração da dentina pode ser verificada com a sua aplicação (ULUSOY et al, 2018).

Outro componente muito utilizado em nanotecnologia é a quitosana. Estudos mostram que a quitosana é capaz de inibir o crescimento e a aderência de *Streptococcus mutans* e outros estreptococos (CARVALHO, 2014; AHMED, 2019). As nanopartículas de quitosana, embora menores que a quitosana, ainda têm atividade antimicrobiana (COVARRUBIAS, 2018). Vários estudos utilizam-se da propriedade mucoadesiva da quitosana para associá-la a outros agentes antimicrobianos em nanoestruturas e assim, potencializar o efeito antibiofilme. Ashrafi et al (2019) avaliou o efeito de óleos essenciais de *Mentha piperita* carregados em um nanogel de quitosana com efeito inibidor sobre a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* na superfície dentária. A formulação mostrou alto potencial para ser aplicado em cremes dentais ou enxaguatórios orais, embora uma forma farmacêutica para o produto ainda não foi estabelecido. Mhaske (2018) avaliou a atividade antimicrobiana da associação de quitosana à clorexidina em enxaguatórios orais e mostrou que ambos foram eficazes no controle de placa bacteriana dentária e que a combinação de ambos fornece resultados ainda melhores. Os estudos encontrados, no entanto, somente avaliaram a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, não levando em consideração a existência de outros microrganismos gram negativos e fungos na microbiota oral.

Outras pesquisas têm despontado por utilizar compostos naturais na tentativa de minimizar os efeitos tóxicos dos agentes antimicrobianos orais tradicionais. Formulações contendo *Camellia sinensis*, própolis, Cramberry, *Mentha piperita* foram encontrados na literatura com atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ONG, 2017; RADAFSHAR, 2017; KHAIRNAR, 2018; ASHRAFI, 2019). A atividade antimicrobiana da própolis se mostrou semelhante à ação da clorexidina contra patógenos orais (ONG, 2017). O mesmo foi visto com a *Camellia sinensis* que mostrou seguro e viável para controle de placa bacteriana (RADAFSHAR, 2017). No entanto, mais estudos são necessários para se avaliar a toxicidade dos componentes e surgimento de recidiva de infecções (KUANG, 2018).

Esses e outros estudos apontam que todas essas intervenções, exceto a remoção mecânica dos biofilmes com escovação periódica diária, têm efeito colateral indesejado e muitas não contribuem para a reicidiva das manifestações orais de origem infecciosa (ARDIZZONI, 2018).

Assim, a utilização de novas técnicas coadjuvantes a terapêutica tradicional nos casos de infecções orais, como o emprego da PDT é apontada como uma nova e promissora abordagem não somente para a eliminação dessas infecções como para um efetivo tratamento profilático das mesmas, evitando o aparecimento e a reicidiva dessas lesões e resistência microbiana (SILVA, 2018; ALVES, 2014; KUANG, 2018).

2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (PDT).

2.5.1 Definição e histórico

A Terapia Fotodinâmica (do Inglês, *Photodynamic Therapy* – PDT) Antimicrobiana, baseia-se em uma reação fotoquímica bastante estudada para aplicação na área da saúde. Nessas reações são usadas moléculas conhecidas como os fotossensibilizadores (FS), os quais são previamente utilizados na impregnação das células alvo. Estes são irradiados no espectro de luz ultravioleta ou luz visível, em determinados comprimentos de onda. Segundo Zanin (2003), na PDT, a eliminação de microrganismos está relacionada com a ativação do depositado no organismo alvo, que após sensibilização transforma oxigênio molecular em oxigênio singlete (1O_2), que é uma espécie reativa de oxigênio que apresenta citotoxicidade. Em geral, o processo causa danos à célula microbiana, mas não são tóxicos às células do hospedeiro (ROCHA et al, 2017).

A terapia fotodinâmica tem sido empregada nas diversas especialidades da Odontologia com o objetivo de redução da carga bacteriana. PDT em bactérias orais começou a ser investigada mais profundamente a partir da década de 90, quando Dobson e Wilson (1992) e Wilson et al. (1993) apud Rancan (2017) demonstraram

bons resultados em reduzir a carga bacteriana utilizando o laser de Hélio-Neônio associado aos FSs azul de toluidina, azul de metileno, ftalocianina e 32 hematoporfirina.

2.5.2 Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica

A PDT é conhecida como fotossensibilização letal (VALLE, 2019), em que é necessária uma impregnação prévia das células microbianas com o FS, para posterior exposição dessas a uma fonte de luz (ZHANG, 2018). O mecanismo proposto ocorre no momento em que o FS, uma vez impregnado nas células alvo passa a ser irradiado por uma fonte de luz apropriada, absorvendo fótons que excitarão as moléculas do FS que passarão do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1) (ROCHA et al, 2017; DEHGHAN, 2017). Este estado S_1 tende a retornar para o estado fundamental, emitindo energia na forma de fluorescência, ou sem emissão de energia, sem emissão de luz, havendo interconversão e cruzamento inter-sistemas (SPRINGER, 2004) Devido ao processo de cruzamento inter-sistemas, ocorre inversão espontânea do spin do elétron excitado. A molécula do FS pode passar do estado S_1 para o estado excitado triplete (T_1) caracterizado pelo tempo de vida muito mais longo do que o estado S_1 (CHEN, 2018). Uma vez formado o T_1 , este estado pode participar em várias reações, podendo decair ao estado S_0 com emissão de fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. A molécula excitada, portanto, pode transferir sua energia para outras moléculas ou começar a reação direta do seu estado excitado (ORMOND, 2013). Esses processos são responsáveis pela sua fotoatividade e seus efeitos fototerapêuticos (KAMKAEW, 2013, ROCHA et al, 2017).

No mecanismo tipo I, o FS no estado (S_1) (estado excitado singlete) ou T_1 (estado excitado triplete) pode, por reações de oxidação e redução com diferentes compostos orgânicos (RH), gerar espécies reativas como peróxidos (ROO^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot), ânion radical hidroxila (OH^\cdot), provocando a destruição da membrana ou de macromoléculas que constituem as células microbianas (OLIVEIRA et al, 2015; ROCHA et al, 2017).

No mecanismo tipo II, a molécula no estado T_1 transfere sua energia para a molécula de oxigênio cujo estado fundamental é triplete (3O_2), formando finalmente seu estado excitado singlete (1O_2) (GRYN'OVA et al, 2015). O oxigênio singlete é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação da célula alvo. Segundo Rocha e colaboradores (2017) o 1O_2 pode induzir várias reações em cadeia com componentes moleculares da célula, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, etc., tendo como resultado a morte da célula microbiana. Estes processos podem ocorrer simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do FS para o O_2 , do solvente e da concentração de O_2 (DUMOULIN, 2012).

2.5.3 Agente fotossensibilizador

Alguns FS são amplamente utilizados em PDT, devido às suas características de baixa toxicidade na ausência de luz em células de mamíferos e seletividade para o tecido alvo, tais como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e curcumina (PERUSSI, 2007). O FS, que pode ser administrado tópico ou sistemicamente, irá corar as células dos microrganismos e será capaz de absorver luz em um comprimento de onda específico (SIQUEIRA, 2016). Um ideal deve ser de fácil obtenção, atendendo às normas de boas práticas de fabricação, às especificações dos ensaios de controle de qualidade, além de ter baixo custo e estabilidade durante o armazenamento (ALMEIDA et al, 2017; ABRAHAMSE, 2016).

A radiação em PDT deve ser realizada por uma luz em comprimento de onda adequado ao espectro de absorção do FS utilizado, levando-se em consideração a capacidade de penetração da luz no tecido biológico e o espalhamento de luz na área da lesão (Nascimento et al, 2016). Nesse contexto, o espectro de absorção do FS deve ser analisado para aplicação em PDT, sendo necessário que absorva a energia da luz emitida para que possa passar pelo processo de transição eletrônica, ocasionando a morte microbiana (ZHANG, 2018).

O FS curcumina vem sendo muito pesquisado nos últimos anos para aplicação em PDT, embora os seus mecanismos de ação antimicrobiana como FS não sejam

totalmente compreendidos (PLOTINO, 2018). É usado na culinária como tempero e também como composto medicinal há séculos (ABRAHAMSE, 2016). Em PDT as características físico-químicas da curcumina a elegeram como excelente FS, pois a extensa conjugação eletrônica presente no esqueleto diarileptanoide da curcumina confere à molécula uma intensa absorção na região do visível com faixa de absorção de 300nm a 500nm e pico máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) em 430nm (LIANG, 2006). Observações experimentais, porém, mostram que a curcumina sofre efeito solvatocrômico, já que ao modificar a polaridade do solvente existe uma alteração do $\lambda_{m\acute{a}x}$ da curcumina, sendo esta vermelha em metanol e amarela em diclorometano (SANTIAGO, 2015).

A curcumina (Figura 1) existe de duas formas em um equilíbrio tautomérico, a 1,3-dicetônica e enólica, sendo que a última é a mais energeticamente estável (SILVA, 2012).

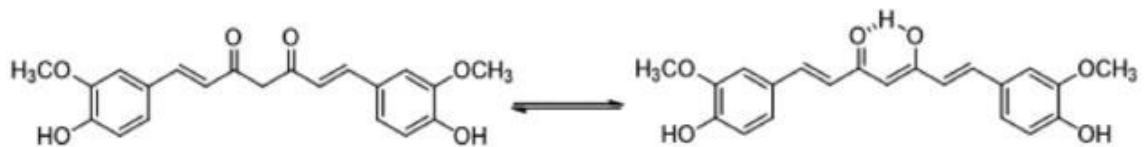


Figura 1: Equilíbrio tautomérico da curcumina.

Além da polaridade do solvente, o pH também interfere no $\lambda_{m\acute{a}x}$ da curcumina, já que em sua estrutura há três hidrogênios ácidos, sendo os hidrogênios adjacentes às duas carbonilas os mais ácidos deles ($pK_a = 8,38$), que poderão ser abstraídos em função do pH do meio. Em faixas de pH entre 3 e 7 existe um equilíbrio ceto-enólico da curcumina deslocado preferencialmente para o sentido do enol, em razão da presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade da molécula, o que favorece a conjugação na cadeia carbônica (SANTIAGO, 2015).

Quando reage com ácido bórico, a curcumina produz um composto vermelho chamado rosocianina (LIU et al, 2019) Curcuminóides têm sido exclusivamente estudados devido a sua ampla variedade de propriedades farmacológicas, em especial à atividade antitumoral (YEDJOU, 2019).

A curcumina é o componente majoritário dos rizomas de *Curcuma longa* e atualmente pode ser obtida comercialmente como uma mistura de três

componentes: curcumina (CUR, ~77%); desmetoxicurcumina (DMC, ~17%); e bisdesmetoxicurcumina (BDMC, ~3%). Possui atividade farmacológica apresentando ação anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante e digestiva (Santiago, 2015). É ativada pela luz azul e encontra a maioria de suas aplicações como FS em PDT na odontologia sendo descrita sua propriedade de erradicar patógenos orais (ABRAHAMSE, 2016)

O potencial antimicrobiano da curcumina em PDT é tema de várias pesquisas recentemente publicadas, sendo a maioria delas relacionada a doenças orais (ARAÚJO et al, 2018; SILVA et al, 2016; SANTEZI, 2018). O seu uso mostrou eficaz contra as mais variadas espécies microbianas, sendo efetiva na descontaminação de cavidades orais com concentrações que variam de 20 a 40µM com redução de mais de 70% do biofilme (RICCI, 2017). Alguns estudos usando PDT e curcumina como FS reportam notável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* usando concentrações de 2,5 a 50 µg/mL (NUÑES, 2013, ARAÚJO et al, 2018) Estudos mostram redução significativa de patógenos orais desde aqueles específicos da microbiota oral, como o *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, como também microrganismos importantes em infecções secundárias como *Staphylococcus aureus* e *E.coli*, o que confere à PDT a propriedade de atuar como um bom método para desinfecção oral (SILVA, et al, 2016; SAKIMA et al, 2018).

Panhóca (2016) estudou a PDT sobre o biofilme de *Streptococcus mutans* utilizando a curcumina e luz LED azul. Os resultados apresentaram redução significativa das unidades formadoras de colônia (UFCs). Araújo (2012) avaliou a suscetibilidade geral de patógenos da flora salivar à PDT após sensibilização com curcumina e exposição à luz azul a 450 nm. Foi observada uma redução estatisticamente significativa na população bacteriana no grupo submetido à PDT ($p < 0,05$). Hsieh e colaboradores (2018) avaliou os efeitos da PDT em biofilmes compostos de *Candida albicans* e efetivamente erradicou o biofilme estudado. Bhavya e Hebbar (2019) estudaram a eficácia da PDT no tratamento de infecções causados por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na presença de FS exógeno (curcumina). Os resultados indicaram uma redução máxima de $5,94 \pm 0,22$ e $5,91 \pm 0,20 \log$ CFU/mL para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, a partir do tratamento com curcumina (20µM) a $13 \text{J}/\text{cm}^2$ de luz azul.

Alguns estudos relatam excelente efeito citotóxico da curcumina como FS para protocolo de PDT sobre *Candida albicans* (DIGOVIGO et al, 2011). Campos (2013)

verificou que o TPI da curcumina sobre o biofilme é uma variável importante nos resultados obtidos e que períodos mais longos (máximo usado de 20 minutos) foram importantes para que a curcumina penetrasse mais profundamente no biofilme e reduzisse o metabolismo da *Candida albicans* (CAMPOS, 2013).

Tessaroli (2010) apresentou alguns estudos da fototoxicidade do FS curcumina contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius* (bactérias gram positivas) e contra *Escherichia coli* (bactéria gram negativa). O FS foi adicionado e depois de 30 minutos as culturas celulares foram irradiadas com uma luz azul emitida por tubos fluorescentes. Mudanças no tempo de incubação, na dose de radiação e, sobretudo, no modo de preparo do influenciaram na atividade fototóxica da curcumina.

Muitos estudos de PDT com FS curcumina costumam utilizar bochechos com 5 mL de solução de FS (1,5 mg/mL) por 1 minuto de TPI, expelindo-a logo em seguida para PDT em mucosa oral. Este tipo de aplicação não possui uma forma farmacêutica definida (SALLUM, 2015).

Apesar de inúmeros estudos usando a curcumina como FS, este composto polifenólico apresenta características hidrofóbicas, e é praticamente insolúvel em água, o que limita a sua solubilidade/dispersão em meio líquido e também a sua biodisponibilidade (CODEVILLA e al, 2015). Devido a isso, uma formulação incorporando curcumina requer um veículo apropriado para aplicação em PDT. Neste contexto, a microemulsão surge como um veículo interessante, podendo incorporar o fármaco na forma solúvel e permitindo sua administração na mucosa oral (NUÑES, 2013).

2.6 ENXAGUATÓRIO ORAL MICROEMULSIONADO

2.6.1 Microemulsão – conceito

As emulsões têm sido amplamente utilizadas na indústria farmacêutica (KAUL et al, 2018). As emulsões são sistemas dispersos constituídos de duas fases líquidas e imiscíveis entre si (fases aquosa e oleosa), estabilizadas pela adição de agentes

tensoativos, localizados na interface óleo/água (FRANGE e GARCIA, 2009). É importante considerar que as emulsões são sistemas dispersos termodinamicamente instáveis devido à alta energia livre na interface entre as duas fases, sendo que o tensoativo atua reduzindo a tensão interfacial, podendo, em muitos casos, ser usado em mistura com outros tensoativos ou em combinação com co-tensoativos (PASCOA, 2012; FORMARIZ, 2008).

Tensoativos são compostos orgânicos que têm comportamento anfifílico, isto é, possuem duas regiões coexistindo em uma única molécula, uma hidrofóbica e outra hidrofílica, e usualmente são empregados para render estabilidade a emulsões (CRUZ, 2013). Podem ser classificados como não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros. Tensoativos catiônicos e aniônicos apresentam cargas elétricas na parte hidrofílica e ao se dissociarem em água, formam íons (FAIT, 2019). Tensoativos anfóteros em condições relativamente neutras de pH, contêm tanto carga negativa quanto carga positiva equilibradas, e seu caráter é afetado quando o pH do meio sofre alterações. Já o tensoativo não iônico não fornece íons em solução aquosa e sua solubilidade em água se deve à presença de grupos funcionais que possuem forte afinidade pela água, como alcoóis, glicóis, éteres e ésteres (KAUR, 2017).

Dependendo do tamanho do glóbulo formado e da técnica utilizada, as emulsões podem ser classificadas em microemulsões (ME), nanoemulsões e macroemulsões (figura 2) (CALLENDER et al, 2017).

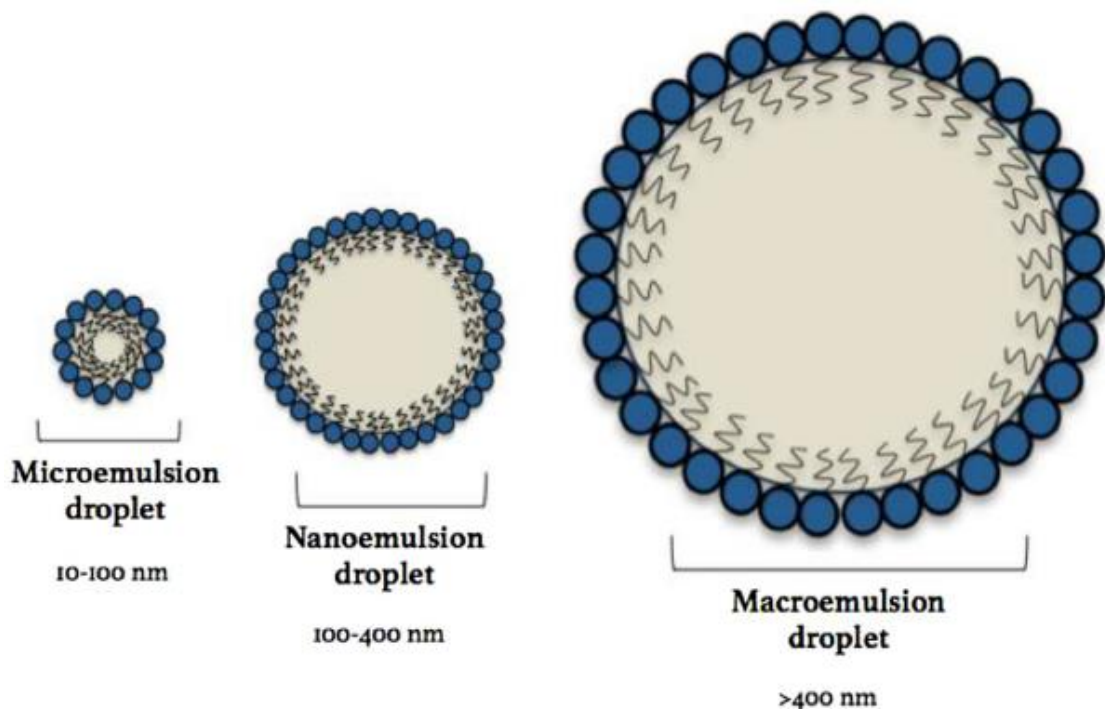


Figura 2: Tipos e tamanhos típicos de diâmetro de gota das macro, nano e microemulsões, no caso representadas como sistema do tipo óleo-em-água. Após a adição do tensoativo, a sua porção apolar orienta-se para a fase oleosa (nesse caso a interna), enquanto a porção polar orienta-se para fase aquosa (externa). Fonte: Callender S, P et al. Utilidade de microemulsão em produtos farmacêuticos: Implicações para o fornecimento de múltiplas drogas. *Int J Pharm.* 2017 Jun 30;526(1-2):425-442.

Dentre a classificação supracitada, as MEs são sistemas coloidais opticamente transparentes, termodinamicamente estáveis, com gotículas variando tipicamente de 10 a 100 nm de diâmetro, que se formam espontaneamente após a mistura de óleo, água e um agente tensoativo (XAVIER-JUNIOR et al, 2017). Podem ser do tipo O/A (óleo-em-água), A/O (água-em-óleo) ou bicontínuas dependendo das propriedades físico-químicas dos tensoativos e, eventualmente, co-tensoativos utilizados (KAUL et al, 2018). Enquanto as emulsões do tipo macro são opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas após agitação mecânica e aquecimento, as MEs apresentam isotropia, sendo límpidas e transparentes, e são formadas espontaneamente a partir da mistura dos seus componentes (DAMASCENO et al, 2011).

Além das diferenças básicas entre macroemulsões e microemulsões, existem na literatura, equívocos com relação aos termos microemulsão e nanoemulsão (SILVA, 2015). Apesar de ambas apresentarem componentes e estruturas semelhantes, as MEs apresentam maior estabilidade termodinâmica que as nanoemulsões. Além disso, as nanoemulsões são cineticamente estáveis, podendo ser armazenadas por longos períodos, mas não são termodinamicamente estáveis como as microemulsões, apresentando-se como preparações leitosas (LIMA, 2018). As proporções de surfactantes nas microemulsões são maiores do que as empregadas nas nanoemulsões, resultando em gotículas menores e inseridas na escala nanométrica (PARIZE, 2009; SILVA, 2015).

Em um sistema microemulsionado A/O, a água é a fase interna descontínua dispersada na fase externa contínua de óleo. O inverso é verdadeiro para um sistema de microemulsão de O/A, onde no interior da gotícula ou fase interna se encontra o óleo, enquanto na fase externa encontra-se a água. As moléculas de tensoativo e co-tensoativos se encontram na interface entre as duas fases (CALLENDER, 2017). Outra estrutura que pode ser formada é a bicontínua. Neste último caso, os componentes hidrofílicos e lipofílicos formam ME com estrutura de canais adjacentes alongados com gotículas na faixa de 1-100 nm, formando uma

rede de tubos aquosos em uma matriz oleosa ou o contrário, uma rede de tubos oleosos em uma matriz aquosa (FORMARIZ, 2008).

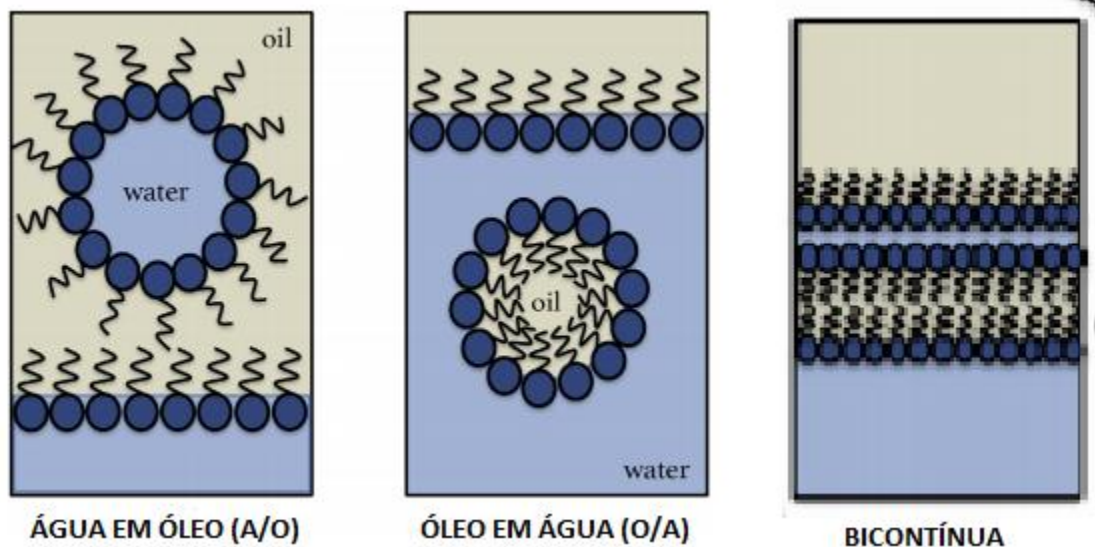


Figura 3: Representação esquemática dos sistemas de microemulsão A/O (esquerda), O/A (meio) e estrutura bicontínua (direita) Fonte: Callender S, P et al. Utilidade de microemulsão em produtos farmacêuticos: Implicações para o fornecimento de múltiplas drogas. *Int J Pharm.* 2017 Jun 30;526(1-2):425-442.

As MEs são formadas pela combinação de três a quatro componentes essenciais: fase aquosa, fase lipofílica, tensoativo e, quando necessário, co-tensoativo (MEHTa, 2015). Existe a necessidade de essas substâncias serem cuidadosamente escolhidas quali e quantitativamente para aplicação em mucosa oral, já que seu uso é limitado devido à sua toxicidade, irritação potencial e mecanismo de ação (NAOUI, 2011). Os óleos e os tensoativos utilizados na formação de MEs suaves e não agressivas devem ser biocompatíveis, não tóxicos e clinicamente aceitáveis (PRETO, 2016).

A formação de sistemas microemulsionados se dá pelo equilíbrio entre as propriedades lipofílicas e hidrofílicas do tensoativo, que resulta em uma máxima solubilização da água e do óleo (LIMA et al, 2018). Para se obter uma formação espontânea desses sistemas, o mesmo deve apresentar estabilidade termodinâmica, com baixa tensão interfacial, próxima ao zero, o que contribuirá para que as gotículas da fase interna tenham uma dimensão nanométrica (NASTITI et al, 2017).

2.6.2 Diagrama de fases pseudoternário (DFPT).

As microemulsões são selecionadas a partir da construção do diagrama de fases pseudoternário (DFPT) (NASTITI, 2017). Para a sua construção é necessário realizar a titulação de amostras com diferentes composições, e após um tempo, realizar a inspeção visual dos resultados, os quais podem se apresentar como emulsões líquidas opacas, separação de fases, como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de baixa ou alta viscosidade (LEITE, 2009). O DFPT é construído em três dimensões a partir de dados obtidos. O gráfico gerado após as análises indica as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (SILVA et al, 2009).

Após a obtenção do gráfico, são selecionados pontos de regiões com características indicativas de microemulsão que podem ser caracterizados quanto ao pH, condutividade elétrica, índice de refração, tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Dessa forma, se define a formulação com as melhores características físico-químicas e de estabilidade (SILVA et al 2009).

2.6.3 Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta.

O raio hidrodinâmico das gotículas é de extrema importância para definir o tipo de formulação, pois uma emulsão tem o raio em torno de 1000 nm, enquanto microemulsões e nanoemulsões apresentam raios menores que 100 nm e 200 nm, respectivamente (FORMARIZ et al, 2008).

O espalhamento de luz dinâmico é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. O movimento browniano (aleatório) das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades e ângulos diferentes (ALBERNAZ, 2014). A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do

movimento browniano e assim, o tamanho do raio dessas partículas pode ser determinado. A característica importante do movimento browniano possibilita a estimativa desse tamanho, sendo que partículas pequenas apresentam movimento rápido enquanto partículas grandes apresentam movimento lento (MALVERN, 2004). Usando a equação de Stokes-Einstein é possível calcular o diâmetro efetivo (D_{ef}), ou diâmetro hidrodinâmico das partículas em equilíbrio térmico com o solvente (FRIBERG e BOTHOREL, 1988):

$$D_{ef} = k_B T / 3\pi\eta D_T$$

Onde:

k_B : Constante de Boltzmann

T: Temperatura

D_T : Coeficiente de difusão translacional (movimento browniano)

η : Viscosidade do solvente.

Destaca-se que partículas com o tamanho maior do que 1 μm estarão sujeitas ao movimento gravitacional, além do browniano, o que faz com que essa técnica seja adequada apenas para a caracterização de partículas < 1 μm (MALVERN, 2004)

A determinação do índice de polidispersividade (Pdl) é bastante útil para caracterizar a distribuição das populações de tamanho das gotículas analisadas. O Pdl se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (MALVERN, 2004). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra. Valores menores que 0,3 são indicativos de baixa polidispersão (NEMEN e SENNA, 2011).

O potencial zeta é um importante indicador de estabilidade física do sistema disperso. Está relacionado com cargas de superfície, oriundas da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula, no meio dispersante ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso onde a gotícula da microemulsão

está dispersa (BALLEST, 2013). Se as cargas elétricas forem de mesma natureza, aparecerá uma força elétrica de repulsão que as manterá afastadas. Caso contrário, se as partículas tiverem cargas elétricas de natureza oposta, em diferentes proporções, teremos forças elétricas de atração que farão ocorrer o fenômeno de floculação e/ou coalescência, além de estar sujeita a sedimentar no fundo do recipiente ou formar sobrenadante na superfície, ocorrendo separação de fases com o tempo de armazenamento, reduzindo sua estabilidade cinética. O potencial zeta em relação a uma superfície de referência pode ser medido em miliVolts (mV), podendo ser um número positivo ou negativo. O valor medido fornece uma indicação a respeito da estabilidade da dispersão. Dispersões com valores de potencial zeta superiores a +20 mV, ou inferiores a -20 mV, são considerados estáveis, enquanto formulações com valores acima de -20 mV e abaixo de +20 mV podem se apresentar instáveis e flocular. Como se percebe, esta propriedade das microemulsões permite uma avaliação objetiva sobre o comportamento estável ou não das mesmas (AULTON, 2016).

A força iônica do meio e a escolha do tipo de tensoativo influenciam diretamente o potencial zeta e tamanho de gotícula. Quanto maior a força iônica do meio, menor o tamanho das gotículas formadas. Como consequência, aumentando a força iônica da solução aquosa, reduz-se a capacidade da fase orgânica de incorporar água e biomoléculas. Por outro lado, tem sido relatado que em força iônica muito baixa, não ocorre separação de fases, mas sim uma microemulsão estável (CRUZ, 2013). O potencial de estabilidade das microemulsões com tensoativos não iônicos é justificado em função de sua relativa estabilidade a agentes que alterem as propriedades do meio, como acidez, salinidade e temperatura, se comparada à dos tensoativos iônicos (AULTON, 2016).

Apesar do potencial zeta das MEs com tensoativos não iônicos ser próximo a zero, a formulação possui estabilidade estérica ou polimérica: a capacidade de formar camadas adsorvidas ao redor das gotículas, de modo que a aproximação das suas superfícies e a agregação para o estado coagulado é inibida (AULTON, 2016).

2.6.4 Aspectos reológicos das microemulsões.

A avaliação das características reológicas das MEs serve como auxílio na caracterização físico-química do produto acabado, principalmente no que se refere à sua qualidade e estabilidade física. Estudos reológicos também oferecem parâmetros relacionados ao processamento da formulação, já que a viscosidade tem influência nas características de enchimento das embalagens em processos industriais de produção em larga escala e também na remoção do produto do material de acondicionamento (SANTOS, 2015). Os aspectos reológicos também influenciam as características de espalhamento e aderência do produto à mucosa oral, bem como a impregnação do FS pelas células alvo (NÚÑES, 2013).

Os aspectos reológicos podem ser classificados como sendo do tipo newtoniano ou não-newtoniano. Um fluido newtoniano apresenta uma viscosidade constante, em dada temperatura, independentemente da força aplicada (ABDULLAH, 2013). A relação entre a tensão de cisalhamento (força de cisalhamento x área) e a gradiente local de velocidade é definida usando uma relação linear, sendo a viscosidade do fluido determinada pela constante de proporcionalidade (DAMASCENO, 2011). De modo contrário, um fluido não-newtoniano caracteriza-se pela alteração da viscosidade quando se altera a tensão de cisalhamento aplicada (ABELS, 2014).

As MEs usualmente comportam-se como fluidos newtonianos, de baixa viscosidade, semelhante à água, até mesmo quando elevadas concentrações de gotículas estão em dispersão e não apresentam comportamento tixotrópico (DAMASCENO, 2011). Tixotropia caracteriza-se pelas alterações reológicas ao longo do tempo quando aplicada uma tensão de cisalhamento constante. Assim, temos fluidos com tixotropia ou fluidos com anti-tixotropia ou reopexia. Se ao longo do tempo a viscosidade da formulação diminuir, para uma tensão de cisalhamento constante, diz-se que apresenta um comportamento tixotrópico (SAIDLER, 2015).

2.6.5 Aplicação das microemulsões.

Substâncias farmacologicamente ativas, quando veiculadas em formas farmacêuticas tradicionais, normalmente não conseguem atingir concentração ideal

no tecido alvo porque, entre o local de aplicação e onde deve haver o efeito farmacológico, existe uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco ou a degradação do ativo antes de chegar ao local onde haverá o efeito farmacológico (OLIVEIRA, 2004). A nanotecnologia, sobretudo as microemulsões, tem progredido no campo da pesquisa e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e cosméticos, aumentando a sua eficácia ao aperfeiçoar a permeabilidade dos fármacos através das barreiras biológicas ou promovendo seu espalhamento em mucosas, facilitando o contato com as áreas a serem submetidas a um dado tratamento, tal como a PDT (KAUL et al, 2018). As MEs são capazes de minimizar os efeitos potencialmente tóxicos dos fármacos, sendo capaz de penetrar as barreiras epiteliais devido às propriedades de seus componentes e ao tamanho pequeno das suas micelas (MITSOU et al, 2019).

Os cosmeceuticos são preparações farmacêuticas que contêm fármacos ou outros princípios ativos cuja eficácia precisa ser comprovada por meio de estudos apropriados. São indicados para o tratamento e a profilaxia de doenças superficiais ou sistêmicas (BARIL et al, 2012), associando as propriedades dos cosméticos com os princípios ativos usados em medicamentos. Nesta categoria podem ser inclusos os enxaguatórios orais contendo princípios ativos para tratamentos específicos (RUIZ et al, 2017). Nanocosmeceuticos usados para cuidados com a pele, cabelos, unhas e lábios, para condições como rugas, fotoenvelhecimento, hiperpigmentação, caspa e danos aos cabelos e para saúde oral têm sido amplamente utilizados (LI D et al, 2011).

A formulação de uma microemulsão apropriada para fins farmacêuticos é um grande desafio, pois todos os excipientes devem ser escolhidos com cuidado para obter um produto final não tóxico, não irritante, e que melhore a penetração e a biodisponibilidade do veículo (RAJERA et al, 2011). Os sistemas microemulsionados mais utilizados utilizam álcoois de cadeia curta em sua composição como co-tensoativos, o que os torna inadequados para uso farmacêutico por apresentarem toxicidade (LEITE, 2009). Nesse contexto, as microemulsões livres de álcool têm sido desenvolvidas, utilizando alguns tensoativos como polissorbato 80, óleo de rícino etoxilado associado à co-tensoativos como propilenoglicol e polietilenoglicol 400, o que as torna de alta relevância farmacêutica por apresentarem reduzida toxicidade (SINTOV e SHAPIRO, 2004).

Alguns estudos de desenvolvimento de nanotecnologias para uso tópico são encontrados (BOONME et al, 2016; JAGDALE, 2017; LIMA et al, 2018). Leite (2009) desenvolveu uma microemulsão para aplicação oral com finalidade antimicrobiana contendo extrato de *Baccharis dracunculifolia*. Alguns estudos utilizando as formulações nanotecnológicas associado à PDT foram encontrados na literatura nos últimos anos (MOHAMMADI, 2017; LI T e YAN L, 2018; SINGH, 2019). Suzuki (2015) avaliou a atividade da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica, os resultados mostraram que é possível deixar a curcumina natural solúvel em água de forma estável através do nanoencapsulamento e a formulação é capaz de inativar bactérias e fungos. Mima (2019) avaliou os efeitos da PDT mediada pela curcumina em nanopartículas poliméricas em um modelo murino de candidíase oral, o tratamento mostrou-se seguro e eficaz contra *Candida albicans*.

Nesse contexto as MEs funcionam como veículo para a incorporação do FS curcumina. Entre suas vantagens está a o retardo da auto-oxidação do FS; aumento da estabilidade e solubilidade do mesmo em fluídos orgânico, além de mascarar o sabor do curcumina. Esta proteção conferida ao ativo poderá potencializar o seu efeito antimicrobiano quando associado à PDT, além de facilitar a adesão pelos pacientes em protocolos clínicos. O presente trabalho trata-se de uma pesquisa inédita e de impacto, já que é de suma importância conduzir pesquisas para criar formulações farmacêuticas que possibilitem terapias fotodinâmicas eficazes, de forma localizada, sem efeitos sistêmicos. O desenvolvimento de uma formulação microemulsionada de uso oral para esse fim, possibilitará o aperfeiçoamento de protocolos clínicos mais efetivos na eliminação de patógenos das infecções orais e, conseqüentemente, no restabelecimento da saúde desses tecidos, favorecendo a implementação dessa rotina de atendimento e tratamento dos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade *in vitro* da PDT antimicrobiana mediada por LED (Light Emitting Diode) azul (450nm) de emissão em dois tempos de radiação (10 e 30 minutos) e intensidade de 18 mW/cm² associada a um enxaguatório baseado em uma formulação de microemulsão (ME) como veículo para o FS curcumina em duas concentrações distintas (30, 60 µg.mL⁻¹) sobre biofilme de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA) e *Escherichia coli*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir diagrama de fase pseudoternário para seleção das potenciais formulações de microemulsão a serem avaliadas;
- Caracterizar a microemulsão para administração na cavidade oral contendo o FS curcumina por meio de ensaios de tamanho de gotícula, medidas de potencial zeta, pH e perfil reológico e densidade relativa.
- Avaliar a estabilidade física e padronizar metodologia analítica para doseamento de curcumina na formulação desenvolvida;
- Avaliar a efetividade *in vitro* da PDT antimicrobiana mediada por LED (Light Emitting Diode) azul (450nm) de emissão em dois tempos de radiação (10 e 30 minutos) associada à formulação desenvolvida contendo FS curcumina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa *in vitro* do tipo experimental desenvolvida em duas etapas, sendo a primeira desenvolvida no laboratório de Farmacotécnica de do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia- IMS/UFBA, em Vitória da Conquista, Bahia e uma segunda parte, no laboratório de Microbiologia do mesmo Instituto.

4.2 ETAPA 1: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOTÉCNICA DE MICROEMULSÃO PARA INCORPORAÇÃO DO FS CURCUMINA

4.2.1 Seleção dos componentes da formulação: Caracterização do ativo e teste de solubilidade

As análises de solubilidade foram realizadas em sala climatizada a 25 °C. A solubilidade foi testada em diferentes solventes: azeite de oliva, óleo de rícino, óleo de abacate, óleo de macadâmia, óleo de linhaça, propilenoglicol e polietilenoglicol (PEG 400).

Foi adicionado 0,01g de curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386 - 65% Curcumina e 35% outros curcuminoides, San Luis, Missouri, EUA) em 12 mL de solvente distribuído em frascos de vidro transparente. As amostras foram submetidas ao ultrassom (Lavadora ultrassônica soniclean 2, Sanders, Thebarton, Australia) por 2 horas a 25°C, e posteriormente embaladas em papel alumínio para proteção contra a luz e deixadas em repouso a temperatura ambiente por 24h para verificar a ocorrência de precipitação. Após este tempo, as amostras foram analisadas macroscopicamente. Foi avaliada a ocorrência de precipitação, turbidez

ou aspecto translúcido. Os veículos que apresentaram o melhor potencial para solubilizar a curcumina foram escolhidos para formulação da microemulsão.

4.2.2 Construção do diagrama de fases pseudoternário (DFPT).

Para a construção do DFPT foi realizada titulação de amostras com diferentes composições. Os excipientes utilizados foram óleo de origem vegetal selecionado conforme descrito no item 4.1.1, com capacidade de solubilizar a curcumina no óleo, tensoativo não iônico polissorbato 80 (Tween 80 – Neon), Ricino etoxilado (Cremophor® RH 40- Embacaps), monolaurato de sorbitano (Span™ 20- Croda), propilenoglicol (Infinity Pharma), polietilenoglicol 400 (PEG 400- Dinâmica), sorbitol 70% (Via Farma) e água miliQ (Milli-Q® Direct- Merk, Darmstadt, Alemanha). Foi realizada inicialmente uma inspeção visual das amostras, sendo classificados como emulsões líquidas opacas, sistemas instáveis com separação de fases, sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de baixa ou alta viscosidade (sugestivos de microemulsões).

Inicialmente as misturas dos componentes tensoativos e co-tensoativos foram adicionadas a fase oleosa selecionada na proporção de 9:1 para realizar uma triagem de um sistema isotrópico, com potencial para construir um DFPT com áreas amplas de microemulsão.

Após selecionar os componentes, as misturas de tensoativos e cotensoativos escolhidos na triagem foram adicionadas à fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações com água deionizada foram realizadas, utilizando uma pipeta automática ajustada para 1000 µL, adicionando a fase aquosa gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada, usando ultrassom por 5 minutos e observando as mudanças do aspecto visual. Foi plotado um gráfico do DFPT indicando os pontos com formação de emulsões líquidas opacas, separação de fases, como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de baixa viscosidade (características representativas das microemulsões) ou alta viscosidade (Cristal líquido).

4.2.3 Incorporação da curcumina nas formulações de microemulsão selecionadas.

Foram escolhidos 3 pontos no DFPT melhor característico de microemulsão para os testes físico-químicos. A curcumina nas concentrações de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi incorporada nas microemulsões selecionadas. Observou-se a solubilidade do ativo nas formulações, de modo a garantir que não ocorressem precipitações do ativo nas preparações selecionadas. A preparação escolhida foi então diluída na proporção de 1:5 com água Milli-Q® (Merk, Darmstadt, Alemanha), sendo esta definida como a concentração final dos seus componentes.



Figura 4: Enxaguatório desenvolvido após a diluição na proporção 1:5 com água Milli-Q® (Merk, Darmstadt, Alemanha).

4.2.4 Caracterizações físico-químicas do produto.

Foram selecionados pontos do DFPT indicativos de microemulsão para caracterização das formulações.

A determinação do pH foi realizada utilizando-se o pHmetro (MS- Tecnopom Instrumentação®, modelo mpA-210, São Paulo, Brasil). O ensaio foi realizado em

triplicata em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e o eletrodo previamente calibrado com tampões de pH 4,0 e 7,0.

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, seguindo-se a metodologia descrita na Farmacópeia Brasileira (2003), utilizando-se como referência água ultrapura Milli-Q® (Merk, Darmstadt, Alemanha). Os picnômetros (SPLabor, São Paulo, SP, Brasil) utilizados foram de 5 mL de capacidade e para retirar as bolhas de ar formadas no sistema o mesmo foi levado a banho ultrassom (UltraSonic – USC 1400, Belo Horizonte MG, Brasil) por 05 minutos. A densidade foi determinada na temperatura de $25,0 \pm 0,5$ ° C em triplicata.

Os ensaios para determinação de tamanho de gotícula e índice de polidispersão, potencial zeta e medidas de condutividade foram realizados usando o equipamento Zetasizer Nano Zs modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Reino Unido) equipado com laser a 633 nm com ângulo fixo de 173° , a temperatura de 25°C usando dispersão dinâmica de luz. Para tanto, preparou-se 100 g da formulação final. Em seguida, filtrou-se em filtro de seringa 0,22 µm. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram coletados e analisados no Zetasizer Software (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Reino Unido).

A avaliação do perfil reológico das microemulsões foi realizada utilizando reômetro Brookfield modelo LVDV-III ULTRA (BrasEq®, São Paulo, Brasil). As medidas foram realizadas a velocidades de rotação progressivamente mais altas (40 a 150 rpm) para se obter as curvas ascendentes. As velocidades de rotação foram definidas de acordo com a capacidade de leitura do equipamento. A partir dos resultados, o coeficiente de viscosidade dinâmico das formulações analisadas foi caracterizado.

4.2.5 Avaliação do espectro de absorção da curcumina na formulação desenvolvida

Foram preparados quatro soluções para análise: enxaguatório microemulsionado contendo curcumina, enxaguatório microemulsionado sem

curcumina, solução padrão de curcumina. Vários diluentes foram testados, sendo selecionada uma mistura de ácido acético 0,5% e PEG 400 na proporção de 80:20 v/v para garantir a solubilização da curcumina. Todas as amostras foram preparadas na concentração de 4 µg/mL para determinação do pico de absorção da curcumina. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Quioto, Japão) (Figura 8), utilizando como branco a solução de ácido acético 0,5% e PEG 400 na proporção de 80:20 v/v. Os espectros foram realizados em triplicata. As amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da leitura.

4.2.6 Doseamento da curcumina por espectrofotometria no UV.

As medidas foram realizadas usando a técnica espectrofotometria no UV-Vis (Eikonal, Modelo SP 220, São Paulo, Brasil). Para isso, cubetas padronizadas de quartzo de 1 cm foram utilizadas. O método analítico foi validado quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão do método. A mistura ácido acético 5% e Polietilenoglicol (PEG 400) na proporção 80:20 v/v foi usada como diluente dos padrões e amostras e o comprimento de onda para leitura foi 430 nm.

A seletividade do método foi determinada quanto às varreduras espectrais realizadas conforme descrito no item 4.1.5, sendo comparados os espectros da formulação placebo, formulação com curcumina e solução padrão de curcumina para verificar possíveis interferências na quantificação da curcumina no comprimento de onda selecionado.

A linearidade do método foi avaliada para demonstrar a relação de proporcionalidade entre a concentração e o valor de absorvância de acordo com a lei de Lambert-Beer. A curva de calibração foi construída empregando três réplicas de cada concentração e o coeficiente de correlação (r) foi calculado. Preparou-se solução padrão estoque de curcumina na concentração de 100 µg.mL⁻¹. A seguir diluições foram preparadas no intervalo de concentrações de 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 µg.mL⁻¹, sendo usado o mesmo diluente.

O parâmetro precisão foi avaliado primeiramente quanto à precisão intra-ensaio (repetibilidade), a fim de demonstrar a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo. Desta forma, realizou-se determinação das concentrações baixa ($2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($3.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata no mesmo dia. A precisão inter-ensaio (precisão intermediária) foi avaliada analisando-se o perfil de dissolução nas mesmas condições no dia consecutivo.

A precisão foi estabelecida como a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (% DPR), calculado pela equação 1, apresentada a seguir:

$$\% \text{ DPR} = (\text{Desvio padrão} / \text{Média}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de curcumina em soluções padrão nas concentrações baixa ($2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($3.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata. O ensaio foi realizado no mesmo dia (intra-ensaio) e em dias diferentes (inter-ensaio).

A exatidão foi calculada pelo percentual de recuperação (E) expresso pela equação 2, apresentada a seguir:

$$E = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 10}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 2})$$

4.2.7 Teste de estabilidade acelerada

Os ensaios de caracterização descritos no item 4.1.3, bem como as determinações de tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e medidas de condutividade usando o equipamento Zetasizer Nano Zs modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Reino Unido). Também foram

realizadas medidas de pH (MS- Tecnopom Instrumentação®, modelo mpA-210, São Paulo, Brasil) e determinação da densidade relativa para caracterizar a estabilidade física do produto.

Os ensaios foram realizados 24 horas após o preparo das formulações (tempo zero) e comparados com os resultados de amostras armazenadas a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15, 30 e 60 dias segundo o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade Acelerada (BRASIL, 2005).

Foi avaliada também a variação de teor da curcumina na formulação durante o período informado usando o método espectrofotométrico padronizado conforme o item anterior.

4.3 ETAPA 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PDT MEDIADA PELAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS NANOTECNOLÓGICAS CONTENDO CURCUMINA

Para avaliar a atividade antimicrobiana da PDT mediada pelas formulações nanotecnológicas contendo curcumina foram utilizadas as cepas ATCC de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (ATCC 33591).

4.3.1 Grupos experimentais

Foram utilizados como corpos-de-prova 270 stops de silicone (Maquira, Curitiba, PR, Brasil) de utilização odontológica, medindo 1,5 mm de diâmetro e 1 mm de altura, que foram esterilizados e armazenados para os testes experimentais. Para a realização do experimento cada grupo foi constituído por 10 corpos de prova divididos de acordo com o microrganismo a ser testado, tipo e concentração do FS

além de diferentes tempos de radiação. Os grupos foram: Controle em que nenhum tratamento foi realizado (L-C-); Somente FS (L-C+); Somente luzes em seus diversos tempos de radiação (L+C-) e Grupos PDT em que foram utilizadas Luz e Enxaguatório com FS em diferentes concentrações (L+C+). Estes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos testados, conforme demonstrado no quadro x.

Quadro 1: Distribuição dos corpos de prova de silicone entre os grupos experimentais.

Tratamentos	Número de corpos de prova		
	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Controle L-C-	10	10	10
Enxaguatório com curcumina 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1mL do) L-C+	10	10	10
Enxaguatório com curcumina 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1mL do) L-C+	10	10	10
Laser 10 minutos L+C-	10	10	10
Laser 30 minutos L+C-	10	10	10
PDT 10 minutos e enxaguatório com curcumina 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; L+C+ (1 mL de + laser)	10	10	10
PDT 10 minutos e enxaguatório com curcumina 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1mL de +laser) L+C+	10	10	10
PDT 30 minutos e enxaguatório com curcumina 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1mL de +laser) L+C+	10	10	10
PDT 30 minutos e enxaguatório com curcumina 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1mL de +laser) L+C+	10	10	10
Total de corpos de prova:	270		

4.3.2 Formação dos biofilmes monoespécie

Para a formação dos biofilmes monoespécies que foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana da PDT, foi realizada primeiramente a ativação das espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* metilino resistente em caldo Brain Heart Infusion – BHI (KASVI, Maringá, PR. Brasil) incubado por 24 horas a 35° + 2° C em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica do Oxigênio- SPLabor, São Paulo, SP, Brasil) e a ativação de *Candida albicans* em caldo Sabouraud dextrose com os mesmos padrões de incubação. Após a ativação, alíquotas de 100 µL do crescimento foram semeadas em placa de Petri contendo ágar BHI (KASVI, Paraná. Brasil) e incubadas por 24 horas a 35° + 2° C em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica do Oxigênio- SPLabor, São Paulo, Brasil).

As culturas recentes de 24h de incubação foram utilizadas para padronização de suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (Eikonal, Modelo SP 220, São Paulo, Brasil), cujos valores de densidade óptica (D.O.) e comprimento de onda (λ) para a quantidade de 1×10^6 cél./mL estão descritas no quadro abaixo, segundo a metodologia de Silva (2008).

Quadro 2 : Comprimento de onda e densidade ópticas utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos utilizados (SILVA; 2008).

Microrganismo	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>Candida albicans</i>	530 nm	0,284
<i>Escherichia coli</i>	590 nm	0,324
<i>Streptococcus mutans</i>	398nm	0,620
<i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente	490nm	0,374

No interior do fluxo laminar, placas estéreis de cultura de células de 24 poços foram preenchidas com 3 mL de meio de cultura caldo BHI (KASVI, paraná. Brasil)

para realização dos testes experimentais da atividade antimicrobiana da PDT sobre *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* metilino resistente e para os testes sobre *Candida albicans* foi utilizado o caldo Saboraud dextrose (KASVI, Paraná, Brasil). Assim, para a formação do biofilme com vistas aos testes experimentais da atividade antimicrobiana da PDT, após o preenchimento e contaminação dos poços das placas de cultura de células de 24 poços, foram acrescentados aos mesmos os corpos-de-prova estéreis de silicone, sobre o qual o biofilme se formará. As placas foram então vedadas e incubadas a 35° + 2° C por 7 dias para a formação dos biofilmes, segundo a metodologia de Araujo e colaboradores (2018) Silva e colaboradores (2019). Durante o período de incubação as condições de cultivo (umidade e nutrição) foram verificadas diariamente. Caso houvesse evaporação do meio de cultura, o mesmo foi repostado para a manutenção da quantidade padronizada durante os sete dias de formação dos biofilmes no estudo.

4.3.3 Fotossensibilizadores

Foi utilizado o FS Curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] (Sigma Aldrich, Referência C1386 - 65% Curcumina e 35% outros curcuminoides, San Luis, Missouri, EUA) para o preparo de soluções de estoque obtidas a partir das diluições da curcumina no enxaguatório microemulsionado desenvolvido nas concentrações de 30 e 60 µg.mL⁻¹. As soluções foram filtradas através de filtros de membrana com poros de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brazil) e armazenadas ao abrigo da luz e em condições adequadas até a utilização.

4.3.4 Fonte de luz

Para a realização dos testes experimentais, foi utilizado o equipamento Biotable[®] RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) que consiste em uma mesa iluminadora de LEDs com os comprimentos de onda de 430, 530 e 630 nm (azul, verde e vermelho, respectivamente). Os LEDs estão dispostos no equipamento de maneira que cada poço da placa de cultura (KASVI, Maringá, PR. Brasil) de células de 24 poços seja iluminado por apenas um LED permitindo produzir iluminação uniforme em toda placa (Figura 5). A potência do sistema pode ser variada, ajustando-se o tempo e intensidade para entregar a dose desejada. O sistema possui resfriamento por passagem de água corrente para que a temperatura seja dissipada e não interfira nos resultados. Os comprimentos de onda utilizados no estudo foi o de 430 nm, com intensidade de 18 mW/cm².



Figura 5: Biotable[®] RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil)

4.3.5 Condições experimentais

Os corpos-de-prova com o crescimento dos biofilmes monoespécies foram transferidos, com o auxílio de pinças estéreis, para poços de placa de cultura de células contendo 1mL de soro fisiológico estéril para lavagem e remoção do excesso de meio de cultura. Logo após, os corpos-de-prova foram transferidos para poços de

placa de cultura de células, onde cada poço continha 1 mL do enxaguatório (30 ou 60 µg/mL, nos grupos L-C+ e L+C+) e deixados em repouso em ambiente escuro pelo período de 5 min (período de pré-irradiação). Após o período de pré-irradiação os corpos-de-prova foram transferidos para novos poços vazios e submetidos à irradiação nos tempos de 10 e 30 min (grupos L+C+ e L+C-). Após a irradiação, os corpos de prova foram introduzidos individualmente em tubos de polipropileno estéreis (de 1,5 ml) contendo 1 mL de soro fisiológico estéril e agitados em aparelho agitador de tubos tipo vortex (Biosystem, modelo AP56, Curitiba, PR, Brasil) durante 1 min para desprendimento do biofilme, obtendo-se uma suspensão inicial. A partir desta, foram realizadas diluições decimais de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A suspensão inicial e as demais diluições foram semeadas em duplicata, em placa de Petri contendo meio de cultura ágar BHI (para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* metilina resistente) ou Sabouraud dextrose (*Candida albicans*) que foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada contagem das unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix, modelo CP602, Araraquara, SP, Brasil). Nos grupos controle (C-L-) nenhum tratamento foi realizado, ou seja, os corpos-de-prova, impregnados pelo biofilme formado, foram apenas submetidos a etapa de lavagem e remoção do excesso e introduzidos diretamente nos tubos de polipropileno contendo soro fisiológico estéril, em seguida foram agitados para obtenção da suspensão inicial e demais diluições, conforme descrito nos demais grupos experimentais.

4.3.6 Análise estatística da atividade antimicrobiana da PDT

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graphpad Prism (versão 5 – 2007, Graphpad Software Inc.). Assim, os dados referentes à UFC/mL foram transformados em log₁₀ e, em seguida, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificação da aderência aos pressupostos de normalidade. Verificada a normalidade dos dados, o teste ANOVA 5% com pós-teste de Bonferroni foi aplicado para comparação entre os grupos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH GZ. *et al.* Carbopol 934, 940 and Ultrez 10 as viscosity modifiers of palm olein esters based nano-scaled emulsion containing ibuprofen. **Pak J Pharm Sci.** 2013;26(1):75–83.
- ABELS C. *et al.* Significant improvement in mild acne following a twice daily application for 6 weeks of an acidic cleansing product (pH 4). **Journal Of Cosmetic Dermatology.** Junho de 2014;13(2):103–8.
- ABRAHAMSE H.; HAMBLIN MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem j.** 2016 Feb 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942.
- Aimetti, M. *et al.* 2015 Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in north italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. **J clin periodontol** ; 42: 622– 631; doi: 10.1902/jop.2017.170164.
- ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014
- AL-MAWERI SA. *et al.* Efficacy of aloe vera mouthwash versus chlorhexidine on plaque and gingivitis: A systematic review. **Int J Dent Hyg.** 2019 Mar 4. doi: 10.1111/idh.12393.
- ALVARES, D; JUNIOR, J. A. Endotoxina na Endodontia . **Artigo Revista Científica da UFPA, V. 7, Nº 01, 2009.**
- ANTUNES, José Leopoldo Ferreira. A saúde bucal na agenda de prioridades em saúde pública **J Dent.** 2018 Mar;70:59-66. doi: 10.1016/j.jdent.2017.12.015. Epub 2017 Dec 28.
- ARAÚJO NC. *et al.* Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomed Laser Surg.** 2012 Feb;30(2):96-101. doi: 10.1089/pho.2011.3053. Epub 2012 Jan 6.
- AULTON, MICHAEL E. **Delineamento de formas farmacêuticas-** 4 ed- Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BALEST, Aiessa Pagliarini. **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).** Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia. Ceilândia 2013
- BARDIA A. *et al.* Preoperative chlorhexidine mouthwash to reduce pneumonia after cardiac surgery: A systematic review and meta-analysis. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2019 Jan 21. pii: S0022-5223(19)30066-2. doi: 10.1016/j.jtcvs.2019.01.014.
- BARIL, M. B. *et al.* nanotecnologia aplicada aos cosméticos nanotechnology applied to cosmetics. **Visão Acadêmica,** Curitiba, v.13, n.1, Jan. - Mar./2012 - ISSN 1518-5192
- BATISTA KZS. *et al.* Influence of comorbidities on CD4+/CD8+ proportion in HIV-positive patients in Blumenau, State of Santa Catarina: a retrospective study. **Rev Soc Bras Med Trop** 50(5):666-669, September-October, 2017
- BETSY, Joseph. *et al.* É Antimicrobial Terapia Fotodinâmica eficaz como adjuvante da raspagem e alisamento radicular em pacientes com periodontite crônica? Uma revisão sistemática.

Biomoléculas. 2017 Dec; 7 (4): 79. Publicado on-line 2017 novembro 24. doi: 10.3390 / biom7040079

BHAVYA ML; UMESH HEBBAR H. Efficacy of blue LED in microbial inactivation: Effect of photosensitization and process parameters. **Int J Food Microbiol**. 2019 Feb 2;290:296-304. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.021. Epub 2018 Oct 25.

BOODRAM S. et al. The Use of Inorganic Compounds in Photodynamic Therapy: Improvements in Methods and Photosensitizer Design. **Recent Pat Nanotechnol**. 2016 Feb 3;11(1):3 - 14.

BOONME P. et al. Microemulsão e microemulsão -Based Gel para tópica antifúngica Terapia com fitoquímicos. **Curr Pharm Des** . 2016; 22 (27): 4257-63. Reveja

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RE nº 398, de 12 de novembro de 2004. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. DOU 16 de novembro de 2005. Disponível em: <http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=13227&word>. Acesso em 20/03/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: **Pesquisa Nacional de Saúde Oral**: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012. 116 p. : il.

CARDOSO, Catia Regina. et al. **Coompreendendo A cárie dental**. Salusvita, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1153-1168, 2017

CHEN WH, Luo GF, Zhang XZ. Recent Advances in Subcellular Targeted Cancer Therapy Based on Functional Materials. **Adv Mater**. 2018 Sep 10:e1802725. doi: 10.1002/adma.201802725. [Epub ahead of print]

CODEVILLA C. F. et al. Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review s5. **Ciência e Natura** v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, p. 153– 163

COLE ST. Who will develop new antibacterial agents? **Phil. Trans. R. Soc.** 2014 B369: 20130430. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0430>

CRUZ, Kelle Gomes. **Sistemas microemulsionados à base de tensoativos hidrocarbônicos para aplicação como suportes para dispersão de compostos antibióticos**. Dissertação de Pós Graduação. Viçosa, Minas Gerais – Brasil 2013

CZAPLEWSKI L. et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. **Lancet Infect Dis**. 2016;16:239–251.

DAMASCENO. B.P.G.L. et al. 4 ; Egito, E.S.T.2. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2011;32(1):9-18

DE OLIVEIRA, K. T et al. Fundamental Concepts and Applications of Photosensitizers of the Porphyrins, Chlorines and Phthalocyanines Type in Photonic Therapies. **Rev. Virtual Quim**. 2015, 7 (1), 310-335

DEHGHAN ESMATABADI, MJ. et al. Review of new insights into antimicrobial agents. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 2017 Feb 28;63(2):40-48. doi: 10.14715/cmb/2017.63.2.6

Draenert R. et al. Novel antibiotics: are we still in the pre-post-antibiotic era? **Infection**. 2015;43:145– 151.

DUDDI, N. et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Four Endodontic Biomaterials against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biomaterials** Volume 2014 (2014), Article ID 383756, 6 pages

DUMOULIN, F. Design and Conception of Photosensitizers. In *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*; Springer: Dordrecht, The Netherlands; Heidelberg, Germany; London, UK, New York, NY, USA, 2012.

EKE, P. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. **J Periodontol.** 2015 May;86(5):611-22. doi: 10.1902/jop.2015.140520. Epub 2015 Feb 17.

EVGENIA M et al. Formulation and Structural Study of a Biocompatible Water-in-Oil Microemulsion as an Appropriate Enzyme Carrier: The Model Case of Horseradish Peroxidase. **Langmuir**, 2019, 35 (1), pp 150–160

FAIT ME, BAKAS L. et al. Cationic surfactants as antifungal agents. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2019 Jan;103(1):97-112. doi: 10.1007/s00253-018-9467-6. Epub 2018 Oct 29.

Farmacopéia Brasileira, 4a ed., Andrei editora: São Paulo, 2003.

FORMARIZ, T. P. et al. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidilcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids Surf. B.**, v. 63, p. 287-295, 2008.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n. 3, p. 263-271, 2009

GERMANO, Victória Escóssia. Et al. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. **Rev. Nova Esperança.** 2018; 16(2): 91-99

GONDIM, Fabiana Gomes Vasconcelos. et al. Evolution of DMF-T/DMF-T and Dental Care Index in Children and Adolescents Based on SB Brasil 2003 and SB Brasil 2010. **Rev. bras ci Saúde**22(4):333-340, 2018

GROENEWEGEN H . *et al.* periodontite grave é mais comum em hiv - pacientes infectados. **J infect.** 2019 mar; 78 (3): 171-177. Doi: 10.1016 / j.jinf.2018.11.008. Epub 06 de dezembro 2018. doi: 10.1016/j.jinf.2018.11.008

GRYN'OVA L , COOTE ML , CORMINBOEUF C . The theory and practice of molecular electronic configurations. **Wiley Interdiscip Rev Mol Comput Sci.** 2015 Nov-Dec; 5 (6): 440-459. Epub 2015 26 de outubro.

Holde GE *et al.* 2017. Periodontitis prevalence and severity in adults: a cross-sectional study in norwegian circumpolar communities. **Journal of periodontology** volume88, issue10. October. doi: 10.1902/jop.2017.170164

HSIEH YH. et al. An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. **Int J Mol Sci.** 2018 Jan 24;19(2). pii: E337. doi: 10.3390/ijms19020337.

JAGDALE S, CHAUDHARI B. Otimização de Microemulsão Based Transdermal Gel de triancinolona. **Recentes Pat Antiinfect Drogas Discov** . 2017; 12 (1): 61-78. doi: 10.2174 / 1574891X12666170426092911.

JOSÉ DILSON F et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Quim. Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-11, 200_, 2015

- KADHIM A. et al. Synthesis and aggregation of a porphyrin cored hyperbranched polyglycidol and its application as a macromolecular photosensitizer for photodynamic therapy. **Mol Pharm**. 2019 Jan 29
- KAMKAEW, A et al. Dyes in photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev**. 2013, 42, 77–88.
- KAUL S. e tal. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. **J Pharm (Cairo)**. 2018 Mar 27;2018:3420204. doi: 10.1155/2018/3420204.
- KAUL S. et al. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. **J Pharm (Cairo)**. 2018 Mar 27;2018:3420204. doi: 10.1155/2018/3420204.
- KAUR G, MEHTA SK. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **Int J Pharm**. 2017 Aug 30;529(1-2):134-160. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.059. Epub 2017 Jun 19.
- L HABIBI. et al. dos efeitos antibacterianos de um veículo produzido em microemulsão sistema de extracto aquoso de Aloe vera com antibióticos seleccionados sobre Enterobacteriaceae. **Irã J Microbiol**. 2018 Oct; 10 (5): 334-341.
- LACZKOWSKI M. S. **Microencapsulação de curcumina com maltodextrina, avaliação da estabilidade e aplicação em alimentos**. VII encontro de produção científica e tecnológica. 2013
- LEE SH. et al. Farmacocinética e farmacodinâmica de uma nova reformulação microemulsão e emulsão de triglicerídeos de cadeia longa de propofol em cães beagle. **Br J Pharmacol** . 2009 Dec; 158 (8): 1982-1995. doi: 10,1111 / j.1476-5381.2009.00509.x.
- LEITE, D. P. V. et al. **Desinfecção oral com terapia fotodinâmica**. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. Anais. Uberlândia, SP. Universidade Federal de Uberlândia, 2014
- LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de Baccharis dracunculifolia para enxagatário oral**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. São Paulo, 2009
- LI D. et al. Advanced carrier systems in cosmetics and cosmeceuticals: a review. **J Cosmet Sci**. 2011 Nov-Dec;62(6):549-63
- LI H. et al. Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. **Biotechnol Adv**. 2019 Feb 1. pii: S0734-9750(19)30010-2. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.010. [Epub ahead of print] LI T, YAN L. Functional Polymer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. **Pharmaceuticals (Basel)**. 2018 Nov 30;11(4). pii: E133. doi: 10.3390/ph11040133.
- LIANG, X. T.; FANG, W. S.; Medicinal chemistry of bioactive natural products, **Wiley**: New Jersey, 2006.
- LIMA MPD. Et al. Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**. 2018 Sep;28(9):691-702. doi: 10.1080/13543776.2018.1519025. Epub 2018 Sep 14.
- LIU Z, TANG J, SUN Y, GAO L. Effects of Photodynamic Inactivation on the Growth and Antifungal Susceptibility of *Rhizopus oryzae*. **Mycopathologia**. 2019 Jan 28.
- LOCALODONTO. Disponível em: <http://www.apcd.org.br/index.php/noticias/904/em-foco/01-06-2017/terapia-fotodinamica-no-combate-a-halitose>. Acesso em: 04 de Fev. 2019.
- MALVERN. Zetasizer Nano Series **User Manual**. User Manuals, England, 2004. Disponível em: < 118 http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf >. Acesso em: 28/01/2018

MASSIMINO, L. C; YOSHIOKA, S.A. Nanopartículas de curcumina: FTIR e solubilidade. Ver **CiêncFarm Básica Apl.**, v35 Supl.1, Agosto 2014.

MATHEWS J, PATEL M. Bacterial endotoxins and microorganisms in the oral cavities of patients on cancer therapy. **Microb Pathog.** 2018 Oct;123:190-195. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.014. Epub 2018 Jul 18.

MEHTA, D.P., RATHOD, H.J. & SHAH, D.P., “Microemulsions: A Potential Novel Drug Delivery System. Department of Pharmaceutics”, Acta Scientifica International. **Journal of Pharmaceutical Science**, 1, 2015.

MIMA, Ewerton Garcia De Oliveira. **PDT mediada pela curcumina em nanopartículas poliméricas em um modelo murino de candidíase oral.** Tese Doutorado. Faculdade de Odontologia (FOAr). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Araraquara. Araraquara, SP, Brasil, 2019.

MOHAMMAD A. et al. Comparação do Efeito antibacteriano de 810 nm do laser de diodo e Terapia Fotodinâmica na redução da flora microbiana do canal de raiz em Endodôntico, em pacientes perirradiculares lesões. **J Lasers Med Sci.** 2016 da mola; 7 (2): 99-104. Publicado on line 2016 Mar 27. doi: 10,15171 / jlms.2016.17

MOHAMMADI Z. et al. Recent Advances in Root Canal Disinfection: A Review. **Iran Endod J.** 2017 Fall;12(4):402-406. doi: 10.22037/iej.v12i4.17935.

MONTI, L. M **Microbiota oral de pacientes HIV positivos:** relação com o uso de drogas antirretrovirais e condições de saúde. [Tese]. Araçatuba: UNESP – Univ.Estadual Paulista; 2014.

NAOUI, W. et al. Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug, **Pharmaceutical Research**, 28, 1683-1695, 2011.

NASCIMENTO, ACDR. et al. **avaliação do espectro de absorção de diferentes fotossensibilizadores**, J XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2016

NASERI N. et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Adv Pharm Bull** 2015;5:305–13.

NASTITI CMRR. et al. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics.** 2017 Sep 21;9(4). pii: E37. doi: 10.3390/pharmaceutics9040037.

NEDA M. et al. Fotodinâmica Inativação de Porphyromonas gingivalis utilizando Radachlorin e Azul de Toluidina O como fotossensibilizadores: Um Estudo in vitro **J Lasers Med Sci.** 2018 da mola; 9 (2): 107-112. Publicado on line 2018 Mar 20. doi: 10,15171 / jlms.2018.21

NOVAES AB JR, PALIOTO DB. Experimental and clinical studies on plastic periodontal procedures. **Periodontol** 2000. 2019 Feb;79(1):56-80. doi: 10.1111/prd.12247.

NUÑES, S. C. PDT- **PDT na odontologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 287 p.

ODA DF. et al. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. **Int Endod J.** 2019 Feb 5. doi: 10.1111/iej.13092.

OLIVEIRA A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova** vol.27 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2004

ORMOND, A.B.; FREEMAN, H.S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials** 2013, 6, 817–840.

PANHÓCA VH. et al. Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy against *Streptococcus mutans* Biofilm in situ. **J Contemp Dent Pract.** 2016 Mar 1;17(3):184-91.

PARIZE, A. **Desenvolvimento de Sistemas microencapsulados e de filmes a base de quitosana e natural cúrcuma.** Dissertação (Doutorado). Programa de pós-graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2009

PASCOA H. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão à base de óleo de sucupira (*P. Emarginatus* vog. Fabaceae) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO 2012

PERALTA SL. et al. Evaluation of physical-mechanical properties, antibacterial effect, and cytotoxicity of temporary restorative materials. **J Appl Oral Sci.** 2018;26:e20170562. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0562. Epub 2018 Aug 20.

PÉREZ-LAGUNA V. et al. Combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review. **Photochem Photobiol Sci.** 2019 Mar 1. doi: 10.1039/c8pp00534f. [Epub ahead of print]

PERUSSI, J. R.. Inativação fotodinâmica de microrganismos, **Química nova**, v. 30, nº4, 988-994, 2007.

PETRUZZI, MNM. et al. Risk factors of HIV-related oral lesions in adults. **Revista de saude publica**, v. 47, n. 1, p. 52-59, Feb 2013.

PLOTINO G, GRANDE NM, MERCADE M. Photodynamic therapy in endodontics. **Int Endod J.** 2018 Dec 12. doi: 10.1111/iej.13057.

PRETO, V. L. S. M. P.. Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança. Bragança 2016

RAJERA, R. et al. Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System. **Biol. Pharm. Bull.** 2011, 34, 945-953.

RANCAN F. L. **Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de *S. gordonii* formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio.** Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre. 2017

RICCI DONATO HA. et al. Clinical Comparison of Two Photosensitizers for Oral Cavity Decontamination. **Photomed Laser Surg.** 35(2):105-110. 2017.

RICCI DONATO HÁ. et al. Clinical Comparison of Two Photosensitizers for Oral Cavity Decontamination. **Photomed Laser Surg.** 2017 Feb;35(2):105-110. doi: 10.1089/pho.2016.4114. Epub 2016 Nov 7.

ROCHA MP, ROSA FCS AND ROSA LP. Chemical and Biological Systems of the Activity Oxygen Singlete in the Destruction of Microbial Cells in Photodynamic Therapy. **SM J Nanotechnol Nanomed.** 2017; 2(1): 1004.

ROSA, Francine Cristina. **Terapia fotodinâmica total da boca mediada por led associado à curcumina e clorina em indivíduos hiv positivo e com aids: análise microbiológica, impacto tecidual por espectroscopia de fluorescência e microscopia espectral.** Tese doutorado. Instituto de física de são Carlos. Universidade de são Paulo.

RUIZ-RUIZ F. et al. Drug Delivery and Cosmeceutical Applications of Poly- Lactic Acid Based Novel Constructs - A Review. **Curr Drug Metab.** 2017;18(10):914-925. doi: 10.2174/1389200218666170919170335. Review.

SAIDLER L. A. **Desenvolvimento de metodologia de preparo de microemulsão de petróleo do tipo água em óleo por aplicação de ondas ultrassônicas.** Dissertação de mestrado. Universidade federal do espírito santo. São Mateus, 2016

SAKIMA VT. Et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. **Molecules.** 2018 Aug 19;23(8). pii: E2075. doi: 10.3390/molecules23082075.

SÄLZER S. *et al.* Eficácia De Controle De Placa bacteriana Mecânica Interdental Na Gestão Gengivite- Uma Meta-Análise. **J Clin Periodontol.** 2015; 42 (Supl. 16): S92-105. Doi: 10.1111/jcpe.12363

SANTEZI C, REINA BD, DOVIGO LN. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A review. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2018 Mar;21:409-415. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.016. Epub 2018 Feb 22.

SANTOS, P. S. S. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno.** Dissertação de Mestrado de Tecnologia Farmacêutica. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto. Outubro 2015

SHREYA K. et al. Nagaich Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. **Journal of Pharmaceutics**, Volume 2018, Article ID 3420204, 19 pages <https://doi.org/10.1155/2018/342020>

SIGRUN EICK. Et al. In Vitro -Atividade de Er: YAG Laser em comparação com outras modalidades de tratamento em biofilme Ablação de implante e dentes Surfaces. **PLoS One.** 2017; 12 (1): e0171086. Publicado on line 2017 Jan 26. doi: 10.1371 / journal.pone.0171086

SILVA, J. A. S. et al. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas;. **Rev. Bras. Farm.** 90(3): 245-249, 2009

SINGH R. et al. Emerging applications of upconverting nanoparticles in intestinal infection and colorectal cancer. **Int J Nanomedicine.** 2019 Feb 7;14:1027-1038. doi: 10.2147/IJN.S188887. eCollection 2019.

SINTOV, A. C, SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of controlled Release.** V95, n.2; p. 173-183, 2004

SIQUEIRA BA, P. et al. **Potencial da curcumina como fotossensibilizador na inativação de *Streptococcus mutans in vitro*** XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2016

SIVASUBRAMANIAN M, CHUANG YC, LO LW. Evolution of Nanoparticle-Mediated Photodynamic Therapy: From Superficial to Deep-Seated Cancers. **Molecules.** 2019 Jan 31;24(3). pii: E520.

SLOTS J1. Focal infection of periodontal origin. **Periodontol 2000.** 2019 Feb;79(1):233-235. doi: 10.1111/prd.12258.

SUZUKI, ISABELA LUIZ. **Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de física de São Carlos, São Carlos, 2015

SZPRINGER, E.; LUTNICKI, K; MARCIANIAK, A. Photodynamic therapy-mechanism and employment. *Ann Univ. Mariae Curie Skłodowska Med.* 59(2): 499-502, 2004

URBAN M. C.C. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 03, jul./set., 2005.

VIANA, M. E. **Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas**. Tese doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, 2006

VITOR SUETH-SANTIAGO. Et al. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas,* *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 4, 538-552, 2015

XAVIER-JUNIOR FH. Et al. Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 May;43(5):700-714. doi: 10.1080/03639045.2016.1235186. Epub 2016 Sep 26.

YEDJOU CG. Et al. Prostate Cancer Disparity, Chemoprevention, and Treatment by Specific Medicinal Plants. *Nutrients.* 2019 Feb 4;11(2). pii: E336. doi: 10.3390/nu11020336. Review.

ZANIN I C J. et al. Terapia Fotodinâmica na Odontologia (TFD). *RGO*, 2003; 51(3): 179-182.

ZANIN, S. M. W. et al. Mouthwisher: Active Principles And Development Of A Formula With Hidroalcoholic Extract Of *Salvia Officinalis* L.; *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.8, n.1, Jan. – Jun./2007 – ISSN: 1518-5192

ZHANG W. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore)*. 2018 May;97(21):e10864. doi: 10.1097/MD.00000000000010864.

6 CAPÍTULO

**Desenvolvimento e avaliação da atividade
antimicrobiana de enxaguatório oral
microemulsionado contendo curcumina para terapia
fotodinâmica intraoral**

Marisol Porto Rocha^{1,2}; Francine Cristina Silva Rosa^{1,2,3}; André Luís Morais Ruela⁴

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

² Grupo de Biofônica Aplicada a Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

³ Endereço para correspondência. (email: drfransilva@yahoo.com.br)

⁴ Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, MG, Brasil

Objetivo: Desenvolver um enxaguatório oral baseado em uma formulação de microemulsão como veículo para o fotossensibilizador (FS) curcumina e avaliar a efetividade *in vitro* do produto desenvolvido, associada à Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (PDT). **Métodos:** Foi construído um diagrama de fase pseudoternário (DFPT) para seleção das potenciais formulações de microemulsão (ME) a serem avaliadas. Foi realizada a caracterização físico-química da ME escolhida por meio de ensaios de tamanho de gotícula, medidas de potencial zeta, pH, densidade relativa e perfil reológico. Foi padronizada metodologia analítica para doseamento da curcumina na formulação desenvolvida por espectrofotometria por UV/Vis. O produto foi submetido a estudo de estabilidade acelerada. Avaliou-se a efetividade *in vitro* da PDT antimicrobiana mediada por LED (Light Emitting Diode) azul (450nm) de emissão em dois tempos de radiação (10 e 30 minutos) associada à formulação desenvolvida contendo FS curcumina em duas concentrações distintas (30 e 60 µg.mL⁻¹) sobre biofilme de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente (ATCC 33591) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). **Resultados:** O produto final foi definido com a composição de Polietilenoglicol 400, polissorbato 80, óleo de linhaça, sorbitol, água e curcumina. pH de 6,21 ± (0,036), densidade relativa de 1 ± 0,0003 g/ml, tamanho de gotículas de 13,86 ± 0,20 nm, índice de polidispersividade igual a 0,151 ± 0,0565, potencial zeta de -10,3 ± 2,6 e comportamento de fluxo newtoniano de baixa

viscosidade $1,64 \pm 0,01$ cP. A formulação final se mostrou estável durante o armazenamento sobre condições forçadas. Houve redução significativa UFC. mL⁻¹ em todos os microrganismos testados (ANOVA 5% e pós-teste de Bonferroni). As maiores reduções de UFC. mL⁻¹ foram de $5,6175 \log 10$ UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (10') e PDT (30'), ambos com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *E. coli*; $5,181 \log 10$ UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (30') e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em MRSA; e $3,497 \log 10$ UFC.mL⁻¹ no grupo PDT (30'), $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *C. albicans*. **Conclusão:** O enxaguatório contendo curcumina desenvolvido é fisicamente estável e efetivo *in vitro* na aplicação em PDT antimicrobiana sobre biofilme dos microrganismos testados.

Palavras-chave: diodo emissor de luz; biofilme; curcumina; enxaguatório bucal; microemulsão.

Introdução

Cárie e doenças periodontais estão entre as doenças crônicas mais comuns no mundo atual. Afeta 60% a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% da população adulta^{1,2}. As doenças orais exercem ônus social, econômico e financeiro enorme em uma escala global^{3,4,5,6}. Para uma boa saúde oral, é necessária a remoção eficiente dos biofilmes orais, no entanto, mesmo em pacientes bem orientados, a limpeza adequada de áreas de difícil alcance e da margem gengival é um procedimento que conserva uma série de dificuldades^{7,8}.

Os diversos enxaguatórios auxiliam no combate aos microrganismos causadores de afecções orais como a cárie dentária, placa bacteriana, cálculo dental, gengivite e periodontite e ainda possuem efeito importante no combate à halitose^{9,10}. Enxaguatórios contendo gluconato de clorexidina são os produtos mais utilizados como tratamento adjuvante no controle do biofilme dentário causador de doenças orais relevantes como cárie e periodontite, sendo considerado padrão ouro para o seu controle^{11,12,13}. No entanto, vários efeitos colaterais foram observados com o seu uso, como alteração temporária da percepção do paladar, aumento dos depósitos de cálculo, sensação de queimação e genotoxicidade das células epiteliais intra-orais¹⁴.

Além dos efeitos mencionados, o principal e mais impactante efeito colateral do uso dos enxaguatórios e outros tipos de agentes antimicrobianos como antifúngicos e antibióticos na Odontologia é, sem dúvida, a geração de espécies de microrganismos resistentes¹⁵. A cavidade oral foi recentemente apontada como um reservatório potencial de genes de resistência a antibióticos que podem ser transferidos *através de* transferência de genes

horizontal entre as bactérias presentes em biofilmes orais^{16,17}. Assim, novas perspectivas na utilização de agentes antimicrobianos na Odontologia, se fazem necessárias. Uma das técnicas antimicrobianas que emergem como condição profilática e/ou terapêutica aos procedimentos convencionais é a Terapia Fotodinâmica (do Inglês, *Photodynamic Therapy* – PDT) antimicrobiana, que é apontada na literatura nacional e internacional como uma nova e promissora abordagem^{10,18}. Trata-se de um método antimicrobiano de alta eficiência independentemente do status de resistência antibiótica presente¹⁵.

A associação da PDT à uma outra tecnologia, a nanotecnologia, através do desenvolvimento de um enxaguatório microemulsionado poderá potencializar a ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica e contribuir para que o fotosensibilizador (FS) se espalhe e se fixe sobre a mucosa oral, em tempo suficiente para que os microrganismos alvos o absorvam e apresentem sensibilidade à luz¹⁹. Além disso, poderá aumentar a permeabilidade do FS sobre as barreiras biológicas dos microrganismos, aumentando e tornando mais eficiente a morte microbiana²⁰. Com o enxaguatório oral microemulsionado é possível ter um produto estável e armazenável pronto para uso em consultório sem qualquer prévia preparação, reduzindo o tempo dos procedimentos da PDT²¹.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar um enxaguatório oral baseado em uma formulação de microemulsão (ME), contendo curcumina e avaliar a sua efetividade *in vitro* em PDT antimicrobiana mediada por LED (Light Emitting Diode) azul (450nm) de emissão em dois tempos de radiação (10 e 30 minutos) sobre biofilme de *C. albicans* (ATCC 90029), MRSA (ATCC 33591) e *E. coli* (ATCC 25922).

Material e métodos

Seleção dos componentes da formulação: Caracterização do ativo e teste de solubilidade

As análises de solubilidade foram realizadas em sala climatizada a 25 °C. A solubilidade foi testada em diferentes solventes: azeite de oliva, óleo de rícino, óleo de abacate, óleo de macadâmia, óleo de linhaça, propilenoglicol e polietilenoglicol 400 (PEG 400). Foi adicionado 0,01g de curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386 - 65% Curcumina e 35% outros curcuminoides, San Luis, Missouri, EUA) em 12 mL de solvente

distribuído em frascos de vidro transparente. As amostras foram submetidas ao ultrassom (Lavadora ultrassônica soniclean 2, Sanders) por 2 horas a 25°C, e posteriormente embaladas em papel alumínio para proteção contra a luz e deixadas em repouso a temperatura ambiente por 24h para verificar a ocorrência de precipitação. Após este tempo, as amostras foram analisadas macroscopicamente. Foi avaliada a ocorrência de precipitação, turbidez ou aspecto translúcido. Os veículos que apresentaram maior potencial para solubilizar a curcumina foram selecionados para formulação da microemulsão.

Construção do diagrama de fases pseudoternário (DFPT)

Para construção do DFPT usou-se óleo de origem vegetal com propriedade de solubilizar a curcumina como fase oleosa, polissorbato 80 (Tween 80 – Neon, SP. Brasil), rícino etoxilado (Cremophor® RH 40) ou monolaurato de sorbitano (Span 20 – Croda, SP. Brasil) como tensoativo não-iônico, propilenoglicol (Infinity Pharma, SP. Brasil), Polietilenoglicol 400 (PEG 400, Dinâmica, SP. Brasil) e/ou sorbitol 70% (Via Farma, Cas:50-70-4, SP. Brasil) como co-tensoativo e água ultrapura (Milli-Q® Direct- Merk, Darmstadt, Alemanha) como fase aquosa. Após selecionar os componentes, as misturas de tensoativos e co-tensoativos foram misturadas à fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As amostras foram tituladas com água ultrapura a temperatura ambiente e homogeneizadas em banho ultrassônico por 5 minutos. Foi plotado um gráfico do DFPT, indicando os pontos com formação de emulsões líquidas opacas, separação de fases, sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de baixa viscosidade (características representativas das MEs) ou sistemas translúcidos com alta viscosidade (cristal líquido).

Incorporação da curcumina nas microemulsões

Foram selecionados três pontos no DFPT com características indicativas de ME. O ponto com melhores características físico-químicas foi diluído em água na proporção de 80:20 de água e ME respectivamente. A curcumina foi incorporada na formulação final nas concentrações de 30 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Observou-se a solubilização do ativo nas formulações, sem precipitação do ativo.

Caracterizações físico-químicas do produto

As preparações estudadas foram submetidas a ensaios de tamanho de gotícula, medidas de potencial zeta, pH, condutividade e perfil reológico. A determinação do pH foi realizada utilizando-se o pHmetro ((MS- Tecnopom Instrumentação®, modelo mpA-210, São Paulo, SP, Brasil), modelo mpA-210. O ensaio foi realizado em triplicata a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). A densidade relativa foi determinada usando picnômetro (SPlabor, São Paulo, SP, Brasil) ^{22,23}. Os picnômetros utilizados foram de 5 mL de capacidade, sendo os mesmos levados a banho ultrassônico (UltraSonic – USC 1400, Belo Horizonte MG, Brasil) para retirar as bolhas de ar. A densidade foi obtida a temperatura ambiente e em triplicata. Os ensaios para determinação de tamanho de gotícula e índice de polidispersão, potencial zeta e medidas de condutividade foram realizados usando o equipamento Zetasizer Nano Zs modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Reino Unido). As medidas baseadas na dispersão dinâmica de luz foram realizadas usando laser a 633 nm com ângulo fixo de 173° , a temperatura de 25°C . Os resultados obtidos foram coletados e analisados no Zetasizer Software (v.6.12). A avaliação do perfil reológico da formulação desenvolvida foi realizada utilizando reômetro Brookfield (modelo LVDV-III ULTRA- BrasEq®, São Paulo, Brasil). As medidas foram realizadas a velocidades de rotação progressivamente mais altas (40 a 150 rpm) para se obter as curvas ascendentes. As velocidades de rotação foram definidas de acordo com a capacidade de leitura do equipamento. A partir dos resultados, o coeficiente de viscosidade dinâmico das formulações analisadas foi caracterizado.

Espectro de absorção da curcumina no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Foram analisadas três amostras para determinação do pico de absorção da curcumina no UV: enxaguatório microemulsionado com curcumina, enxaguatório microemulsionado sem curcumina e solução padrão de curcumina. As amostras foram preparadas na concentração de $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ usando ácido acético 0,5% e PEG 400 como diluente na proporção de 80:20 v/v e analisadas em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Quioto, Japão). As varreduras espectrais foram realizadas em triplicata. As amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da leitura.

Doseamento da curcumina

Foi preparada a solução padrão estoque de curcumina na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diluída em ácido acético 0,5% e polietilenoglicol (PEG 400) 80:20 v/v. A seguir, foram preparadas diluições usando o mesmo diluente para obter soluções padrão de curcumina nas concentrações de 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi avaliada a relação de proporcionalidade entre a concentração e o valor de absorvância de acordo com a lei de Lambert-Beer. As leituras foram realizadas a 430 nm. A seletividade do método foi determinada pela comparação dos espectros da formulação placebo, formulação com curcumina e solução padrão de curcumina. Os parâmetros de linearidade, precisão intra e inter ensaios e exatidão intra e inter ensaios do método foram avaliados.

Teste de estabilidade acelerada

Os ensaios foram realizados 24 horas após o preparo das formulações (tempo zero) e comparados com os resultados de amostras armazenadas a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15, 30 e 60 dias. Os ensaios de caracterizações físico-químicas do produto, bem como as determinações de tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e medidas de condutividade foram realizadas para determinar a estabilidade física do produto. Foi avaliada também a variação de teor da curcumina na formulação durante o período informado usando o método espectrofotométrico padronizado.

Atividade antimicrobiana da PDT do enxaguatório bucal microemulsionado contendo curcumina

Grupos experimentais

Foram utilizados como corpos-de-prova 270 stops de silicone (Maquira, Curitiba, PR, Brasil) de utilização odontológica, medindo 1,5 mm de diâmetro e 1 mm de altura, que foram

esterilizados e armazenados para os testes experimentais. Para a realização do experimento cada grupo foi constituído por 10 corpos de prova divididos de acordo com o microrganismo a ser testado, tipo e concentração do fotossensibilizante além de diferentes tempos de radiação. Os grupos foram: Controle em que nenhum tratamento foi realizado (L-C-); Somente FS (L-C+); Somente luzes em seus diversos tempos de radiação (L+C-) e Grupos PDT em que foram utilizadas Luz e Enxaguatório com FS em diferentes concentrações (L+C+).

Formação dos biofilmes monoespécie

Para a formação dos biofilmes monoespécies que foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana da PDT, foi realizada primeiramente a ativação das espécies bacterianas *E. coli* (ATCC 25922) e *MRSA*(ATCC 33591) em caldo Brain Heart Infusion – BHI (KASVI, Maringá, PR. Brasil) incubado por 24 horas a 35° + 2° C em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica do Oxigênio- SPlabor) e a ativação de *C. albicans* (ATCC 90029) em caldo Sabouraud dextrose (KASVI, Maringá, PR. Brasil) com os mesmos padrões de incubação. Após a ativação, alíquotas de 100 µL do crescimento foram semeadas em placa de Petri contendo ágar BHI (KASVI, Maringá, PR. Brasil) ou ágar Sabouraud (*C. albicans*) e incubadas por 24 horas a 35° + 2° C em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica do Oxigênio-SPlabor).

As culturas recentes de 24h de incubação foram utilizadas para padronização de suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto, Japan), cujos valores de densidade óptica (D.O.) e comprimento de onda (λ) para a quantidade de 1×10^6 cél./mL estão descritas no quadro abaixo, segundo a metodologia de Silva (2008).

Quadro 1: Comprimento de onda e densidade ópticas utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos utilizados. Silva (2008) –

Microrganismo	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>C. albicans</i>	530 nm	0,284
<i>E. coli</i>	590 nm	0,324
MRSA	490nm	0,374

No interior do fluxo laminar, placa estéreis de cultura de células de 24 poços foram preenchidas com 3 mL de meio de cultura caldo BHI (KASVI, Maringá, PR. Brasil) para realização dos testes experimentais da atividade antimicrobiana da PDT sobre *E. coli* e *MRSA* e para os testes sobre *C. albicans* foi utilizado o caldo Saboraud dextrose (KASVI, Maringá, PR. Brasil). Assim, para a formação do biofilme com vistas aos testes experimentais da atividade antimicrobiana da PDT, após o preenchimento e contaminação dos poços das placa de cultura de células de 24 poços, foram acrescentados aos mesmos os corpos-de-prova estéreis de silicone, sobre o qual o biofilme se formará. As placas foram então vedadas e incubadas a $35^\circ + 2^\circ$ C por 7 dias para a formação dos biofilmes, e durante o período de incubação as condições de cultivo (umidade e nutrição) foram verificadas diariamente. Caso houvesse evaporação do meio de cultura, o mesmo foi repostado para a manutenção da quantidade padronizada durante os sete dias de formação dos biofilmes no estudo.

fotossensibilizador

Foi utilizado o FS Curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] (Sigma Aldrich, Referência C1386 - 65% Curcumina e 35% outros curcuminoides, San Luis, Missouri, EUA) para o preparo de soluções de estoque obtidas a partir das diluições da curcumina no enxaguatório microemulsionado desenvolvido nas concentrações de 30 e 60. As soluções foram filtradas através de filtros de membrana com poros de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, São Paulo, Brazil) e armazenadas em condições adequadas até a utilização.

Fonte de luz

Para a realização dos testes experimentais, foi utilizado o equipamento Biotable[®] RGB (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) que consiste em uma mesa iluminadora de LEDs com os comprimentos de onda de 430, 530 e 630 nm (azul, verde e vermelho, respectivamente). Os LEDs estão dispostos no equipamento de maneira que cada poço da placa de cultura de células de 24 poços (KASVI, Maringá, PR. Brasil) seja iluminado por apenas um LED permitindo produzir iluminação uniforme em toda placa. A potência do sistema pode ser variada, ajustando-se o tempo e intensidade para produzir a dose desejada. O sistema possui resfriamento por passagem de água corrente para que a temperatura seja dissipada e não interfira nos resultados. Os comprimentos de onda utilizados no estudo foi o de 430 nm, com intensidade de 18 mW/cm², segundo a metodologia de Araújo⁴⁶.

Condições experimentais

Os corpos-de-prova com o crescimento dos biofilmes monoespécies foram transferidos, com o auxílio de pinças estéreis, para poços de placa de cultura de células (KASVI, Maringá, PR. Brasil) contendo 1mL de soro fisiológico estéril para lavagem e remoção do excesso de meio de cultura. Logo após, os corpos-de-prova foram transferidos para poços de placa de cultura de células, onde cada poço continha 1 mL do enxaguatório (30 ou 60µg.mL⁻¹, nos grupos L-C+ e L+C+) e deixados em repouso em ambiente escuro pelo período de 5 min (período de pré-irradiação). Após o período de pré-irradiação os corpos-de-prova foram transferidos para novos poços vazios e submetidos à irradiação nos tempos de 10 e 30 min (grupos L+C+ e L+C-). Após a irradiação, os corpos de prova foram introduzidos individualmente em tubos de polipropileno estéreis (de 1,5 ml) contendo 1 mL de soro fisiológico estéril e agitados em aparelho agitador de tubos tipo vortex (Biosystem, modelo AP56) durante 1 min para desprendimento do biofilme, obtendo-se uma suspensão inicial. A partir desta, foram realizadas diluições decimais de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. A suspensão inicial e as demais diluições foram semeadas em duplicata, em placa de Petri contendo meio de cultura ágar BHI (para *E. coli* e MRSA) ou Sabouraud dextrose (para *C. albicans*) e incubadas a 35° +2°C durante 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada contagem das unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix,

modelo CP602, Araraquara, SP, Brasil). Nos grupos controle (C-L-) nenhum tratamento foi realizado, ou seja, os corpos-de-prova, impregnados pelo biofilme formado, foram apenas submetidos a etapa de lavagem e remoção do excesso e introduzidos diretamente nos tubos de polipropileno contendo soro fisiológico estéril, em seguida foram agitados para obtenção da suspensão inicial e demais diluições, conforme descrito nos demais grupos experimentais.

Análise estatística da atividade antimicrobiana da PDT

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graphpad Prism (versão 5 – 2007, Graphpad Software Inc.). Assim, os dados referentes à UFC.mL⁻¹ foram transformados em log₁₀ e, em seguida, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificação da aderência aos pressupostos de normalidade. Verificada a normalidade dos dados, o teste ANOVA 5% com pós-teste de Bonferroni foi aplicado para comparação entre os grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos componentes da formulação

O estudo de solubilidade da curcumina em diferentes solventes mostrou que a mesma exibe uma lenta e baixa taxa de dissolução em água devido à sua hidrofobicidade, o que pode ser evidenciado pela baixa molhabilidade do pó em contato com meios aquosos²⁴. Quanto aos solventes testados, os resultados mostraram que os solventes PEG 400, propilenoglicol, óleo de linhaça e óleo de rícino apresentaram solubilização completa da curcumina, formando soluções límpidas e translúcidas, o que já era esperado considerando suas características apolares. O azeite de oliva, óleo de abacate e óleo de macadâmia apresentaram visível turbidez, indicando baixa solubilização do ativo. A alta solubilidade da curcumina em PEG 400 foi um dos principais fatores que permitiram a sua incorporação na formulação. O PEG 400 estabelece ligações de hidrogênio tanto com os componentes da curcumina bem como com as moléculas da água, atuando como um eficiente agente dispersante. O PEG 400 é

amplamente utilizado em formulações de uso oral por possuir baixa toxicidade e baixo custo²⁵.

Desta maneira, selecionou-se o óleo de linhaça como fase oleosa e PEG 400 como co-tensoativo para os testes seguintes. O tween 80 foi selecionado como tensoativo da formulação. São ésteres de ácidos graxos de sorbitano aprovados em várias farmacopéias, como a americana²⁷ e europeia²⁶.

Apesar da curcumina não apresentar alta solubilidade em solução de sorbitol 70% p/v, a inclusão deste componente foi explorada na formulação com a função de edulcorar o enxaguatório bucal. O sorbitol é considerado um adoçante, possuindo ainda função como agente umectante e modificador da viscosidade em produtos alimentícios e cosméticos. O sorbitol é cerca de 60% tão doce quanto à sacarose, porém não apresenta potencial cariogênico. O sorbitol é resistente ao metabolismo por bactérias bucais que quebram açúcares e amidos para liberar ácidos que podem levar às cáries ou à corrosão do esmalte dos dentes, por isso é excelente flavorizante em produtos de uso oral⁷⁴.

Diagrama de fases pseudoternário

O DFPT foi construído conforme os critérios estabelecidos no teste anterior. Definiu-se o Tween 80 como tensoativo, mistura de PEG 400 e sorbitol como co-tensoativos e o óleo de linhaça como fase oleosa. O diagrama de fases foi plotado graficamente usando Software Origin 10.5.18.58059. Nota-se pela figura 1 a existência de área ampla com indicativo de formação de ME, com predominância de altas concentrações de tensoativos/co-tensoativos. Entretanto, nessas condições, quando a fase aquosa é diminuída, permite a formação de sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de alta viscosidade, indicativos de cristais líquidos²⁸. Esses agregados tornam-se mais estruturados quando um óleo ou mesmo outros componentes, como outro tensoativo ou um álcool de cadeia média, é adicionado ao sistema tensoativo-água. Dessa forma, emulsões, microemulsões e mesofases liotrópicas de diferentes geometrias podem ser formadas²⁸.

Dentre as regiões identificadas na DFPT, foram selecionados três pontos da região com ampla formação de MEs para caracterização físico-química.

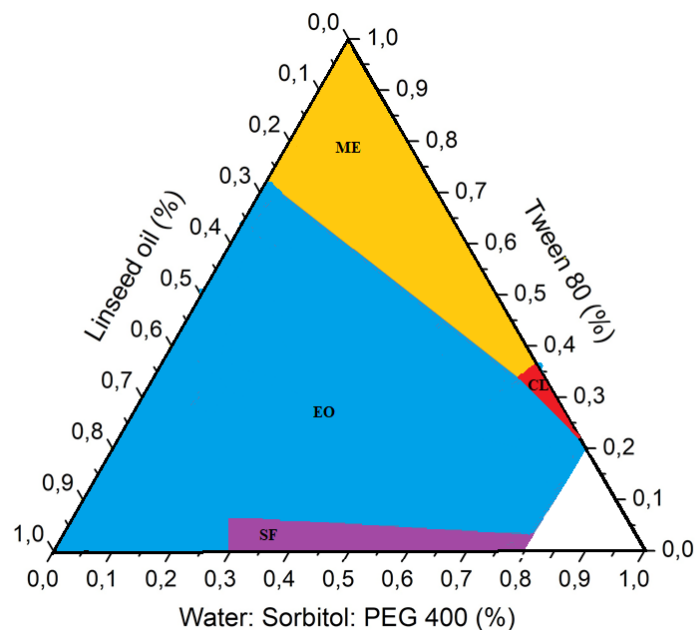


Figura 1. Diagrama de fases pseudoternário formado por Tween 80, água/PEG400/sorbitol 70% (6:3:1) e óleo de linhaça. **(ME)** sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de baixa viscosidade (características representativas das microemulsões), **(EO)** Emulsão opaca; **(SF)** Separação de fases e **(CL)** sistemas translúcidos ou opticamente transparentes de alta viscosidade (Cristal líquido).

Seleção da ME

Foram selecionados três pontos do diagrama para avaliação do melhor sistema microemulsionado. Os critérios para escolha dos pontos foram: sistemas com maior concentração de água, concentração intermediária de tensoativos/co-tensoativos e menor concentração de fase oleosa. A seleção dos pontos foi baseada no aspecto macroscópico da formulação, direcionando a pré-seleção da composição das formulações. Os pontos 1, 2 e 3 selecionados no DFPT foram avaliados quanto ao tamanho de gotículas e o índice de polidispersividade. Os resultados se encontram na tabela 1

Tabela 1. Tamanho de gotículas e o índice de polidispersividade das formulações inicialmente selecionadas (n=3).

Microemulsão	Tamanho de gotículas (nm)± DP	Índice de polidispersividade ± DP
Ponto 1	94 ± 1,5	0,487± 0,030
Ponto 2	122 ± 9	0,441 ±0,030
Ponto 3	346 ± 43,5	0,421±0,008

Quanto as características físico-químicas, o ponto 1 apresentou menor tamanho de gotícula ($94 \pm 1,5$ DP), sendo escolhido para os testes posteriores. É importante notar que todas as formulações inicialmente analisadas apresentaram índice de polidispersividade maior que 0,3, indicando uma alta polidispersão da fase oleosa dispersa. Este resultado pode ser associado ao elevado número de gotículas da fase dispersa, e/ou a aglomeração das gotículas, o que pode ocorrer devido ao tensoativo incluído na formulação ser do tipo não iônico (Tween 80), levando a formação de um sistema floculado²⁹.

Incorporação da curcumina à microemulsão selecionada.

Para obter o produto final, o ponto 1 foi diluído na proporção de 20:80 de ME e água respectivamente, sendo definido como a composição final do produto para avaliações posteriores. As características físico-químicas desta formulação foram avaliadas após a incorporação da curcumina em duas concentrações: $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os parâmetros físico-químicos se encontram na tabela 2.

Nota-se que após a diluição do ponto 1 (Tabela 2), houve redução do tamanho de gotícula (menor que 20nm), provavelmente relacionado à redução da concentração de fase dispersa anteriormente detectada, que possivelmente contribuía para formação de um sistema floculado. Caracterizou-se desta forma a sua natureza nanométrica da fase dispersa, com tamanho de gotícula inferior a 100nm²⁸.

O PDI da formulação de ME (ponto 1) foi expressivamente reduzido a partir da sua diluição com água, pois anterior a diluição o sistema apresentava-se como floculado com alta

concentração de fase dispersa. A técnica de espalhamento de luz dinâmica pode detectar um flóculo como um único glóbulo de maior tamanho, levando à caracterização de um sistema flocculado como polidisperso ($PDI > 0,3$)³⁰. Após a diluição da formulação com água, os valores encontrados foram menores que 0,3 na formulação final, independente da variação de concentração de curcumina (de 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O baixo valor de PDI, juntamente com o pequeno tamanho de gotícula é indicativo de maior estabilidade física do sistema^{30,31}.

Os valores de densidade relativa e pH também não se alteraram com o aumento da concentração de curcumina na formulação (Tabela 2), tendo uma média de 6,28. O pH se mostrou próximo da neutralidade e propício para administração na mucosa oral (pH salivar: 7,00). Esse dado é relevante já que a dissolução dos tecidos dentais se inicia quando o pH na superfície dentária atinge valores abaixo de 5,5³². Ao se ingerir substâncias ácidas ocorre queda do pH salivar provocando uma mudança do fluido na superfície do esmalte, favorecendo a solubilização de hidroxiapatitas e consequente desmineralização. Deste modo, a formulação apresenta potencial reduzido de induzir erosão dentária^{32,33,34}.

As formulações permitiram a solubilização do ativo, apresentando forte coloração amarela, aspecto translúcido e com brilho, sem a visualização de precipitações. Associa-se a alta solubilidade do ativo (curcumina) na ME, principalmente, à presença do PEG 400, sendo que o tensoativo e a fase oleosa contribuíram de modo auxiliar para a solubilização da curcumina. Considerando a composição do sistema, com reduzido teor de fase oleosa, pode-se pressupor que o sistema formado é do tipo óleo-em-água (O/A), sendo que pelas características hidrofóbicas da curcumina, é esperado que o ativo estivesse solúvel no filme tensoativo ou nos glóbulos da fase dispersa, estando solúvel de maneira minoritária na fase dispersante aquosa.

Em nível de fornecimento de informações para o controle de qualidade do produto desenvolvido, a densidade relativa foi caracterizada e nota-se que o valor obtido é de $1 \pm 0,000$ g/mL, evidenciando que a densidade do produto é próximo da densidade da água na temperatura de 20°C. Isso permite fácil escoamento e bom espalhamento do produto na cavidade oral.

Tabela 2. Tamanho de gotículas, índice de polidispersividade, pH e densidade relativa das formulações de enxaguatório oral (n=3).

Formulação	Tamanho de gotícula ± DP (nm)	PDI ± DP	pH ± DP	Densidade relativa ± DP
Sem curcumina	16,66 ± 2,510	0,184± 0,090	6,47 ±0,025	1 ±0,000
30 µg.mL ⁻¹	14,66± 0,577	0,143± 0,090	6,24± 0,083	1± 0,000
60 µg.mL ⁻¹	15,10 ± 0,056	0,151 ± 0,056	6,21±0,119	1,00± 0,000

nm, nanômetro; PDI, índice de polidispersividade; DP: Desvio padrão

Avaliação do espectro de absorção da curcumina na formulação desenvolvida

As varreduras espectrais do enxaguatório microemulsionado com e sem curcumina e solução padrão de curcumina de 4 µg.mL⁻¹ estão apresentadas na figura 2.

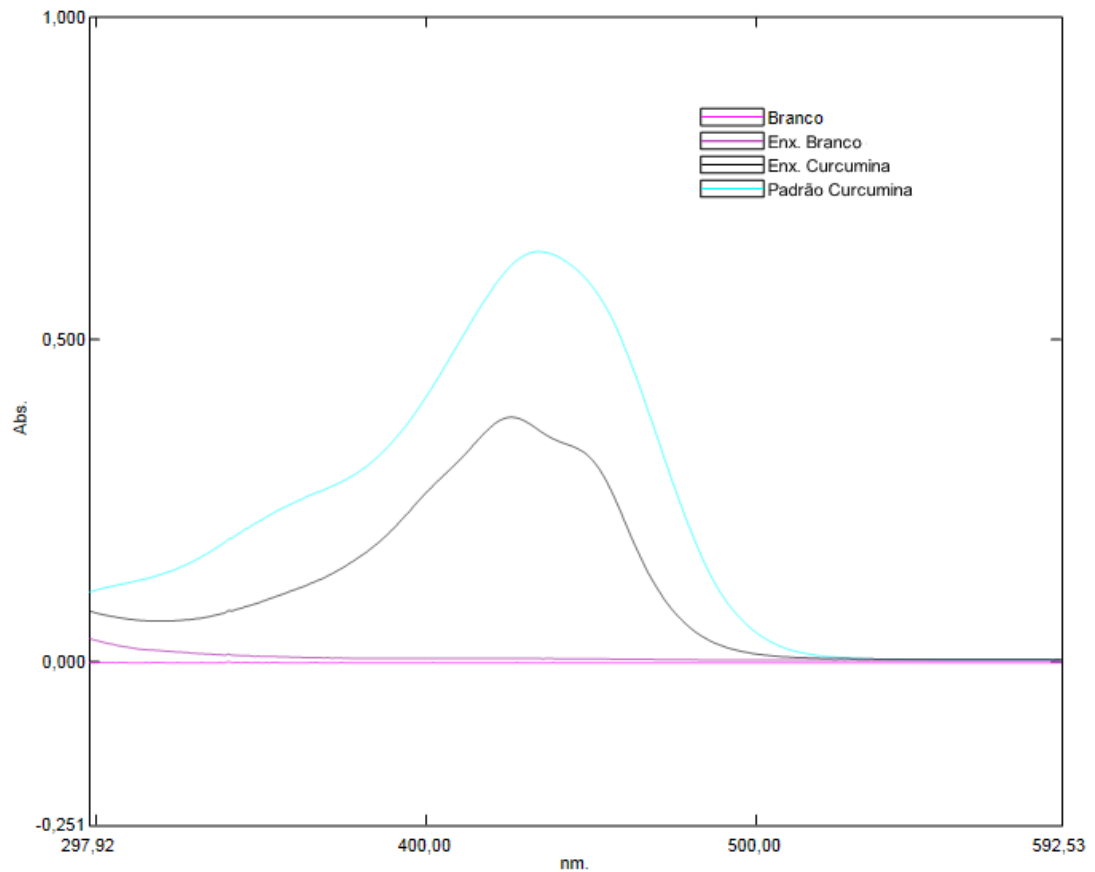


Figura 2. Espectro de absorção do enxaguatório microemulsionado com e sem curcumina e solução padrão de curcumina a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para solução padrão, detectou-se o pico de absorção máximo em 434 nm, e para a formulação, o pico deslocou-se para 426 nm. Pela figura 2, observou-se que a formulação de enxaguatório sem curcumina não apresentou picos de absorção na faixa de comprimento de onda de máxima absorção da curcumina. É possível notar que na faixa de 400nm a 500nm, o enxaguatório microemulsionado sem curcumina não apresenta absorbância expressiva.

O pH de todas as soluções foram padronizadas para 4 visto que este é um fator que afeta os resultados analíticos. Laczkowski³⁵ realizou leituras da curcumina diluída em etanol e água (4:1) em pH variando de 3 a 7 e notou um λ_{max} de 430nm, sugerindo que o pico de absorção da curcumina é dependente do solvente e da faixa de pH. Os resultados desta pesquisa corroboram com os resultados da literatura quanto ao λ_{max} encontrado (média de 430nm). O ácido acético favoreceu a maior solubilidade da curcumina em todas as alíquotas testadas, conforme já consolidado na literatura^{72, 73}.

Doseamento da curcumina por espectrofotometria no UV-Vis

Ao analisar a figura 2 foi possível caracterizar a seletividade do método analítico para quantificação da curcumina. Observou-se que os componentes do enxaguatório não apresentaram picos de absorção na faixa de comprimento de onda de máxima absorção da curcumina que variou de 400nm a 500nm, sendo selecionado o comprimento de 430 nm para quantificação do fármaco. A linearidade foi caracterizada pela equação da reta $y = 0.18465 (\pm 0.00295) x + 0.00685 (\pm 0.00295)$. O coeficiente de correlação (r) foi $0.99683 (\pm 0.00111)$, ou seja, superior a $r > 0,99$, indicando que os dados foram satisfatoriamente ajustados ao modelo matemático da regressão linear. O resultado mostrou-se altamente preciso com DPR menor que 1% tanto no estudo *inter-dia* quanto *intra dias*, portanto, menor do que o valor máximo exigido de 5% segundo as especificações da RDC 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [36] (Tabela 3). O percentual de exatidão do método desenvolvido foi verificado para três níveis de concentração: baixa ($2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($3.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e apresentou valor médio de 100,28 % no primeiro dia e 99,82% no segundo. Pequenas variações da concentração de curcumina podem ser prontamente quantificadas pelo método espectrofotométrico, bem como não há interferência dos excipientes no doseamento do produto final. Sendo assim, o método analítico desenvolvido demonstrou-se linear, seletivo, preciso e exato.

Tabela 3. Resultados do estudo de precisão e exatidão intra-dia do método de doseamento da curcumina no enxaguatório oral usando espectrofotometria no UV.

Concentração teórica	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Precisão intra-dias	Exatidão intra-dias %	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Precisão inter-dias	Exatidão inter-dias %
2,0	1,92 \pm DP	96,08	1,89 \pm DP	94,59
3,5	3,59 \pm DP	102,51	3,63 \pm DP	103,82
5,0	4,89 \pm DP	97,82	4,92 \pm DP	98,36

DP, desvio padrão.

Estabilidade acelerada

O enxaguatório oral microemulsionado contendo curcumina $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi armazenada em estufa a $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A tabela 4 apresentam os resultados do estudo de estabilidade.

Tabela 4. Estudo da estabilidade física a $40\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ do enxaguatório oral micromeulsionado

Tempo (dias)	Tamanho de gotícula \pm DP	PDI \pm DP	Potencial zeta \pm DP (mV)	pH \pm DP	Teor \pm DP (%)	Densidade relativa \pm DP
0	14 ± 1	$0,151 \pm 0,0565$	$-7,7 \pm 1,2$	$6,24 \pm 0,11$	$101,63 \pm 0,78$	$1,008 \pm 0,001$
15	27 ± 9	$0,024 \pm 0,030$	ND	$5,78 \pm 0,13$	$101,12 \pm 1,23$	$1,017 \pm 0,002$
30	15 ± 1	$0,159 \pm 0,012$	ND	$5,70 \pm 0,04$	$93,11 \pm 0,33$	$0,983 \pm 0,012$
60	27 ± 1	$0,282 \pm 0,002$	$-10,3 \pm 2,6$	$6,12 \pm 0,15$	$95,20 \pm 0,55$	$1,016 \pm 1,155$

ND, não determinado; DP, desvio padrão; PDI, índice de polidispersividade

Em relação ao aspecto macroscópico, em todos os tempos de amostragem durante o estudo de estabilidade, não houve alterações no aspecto da formulação. O produto se comportou como um sistema de fase única e homogêneo, sem indicativos de precipitações ou formação de grumos, e também sem apresentar alterações perceptíveis de cor e odor.

Os valores de potencial zeta entre a análise inicial e após 60 dias não foram significativamente diferentes ($p=0,0820$). Apesar de não haver diferença estatística, os resultados de potencial zeta indicaram que os valores em ambos os tempos foram inferiores, em módulo, a 20 mV. Esse resultado se deve a utilização do tensoativo Tween 80. Por se tratar de um tensoativo não iônico, o Tween 80 promove a estabilização estérica dos glóbulos da fase dispersa, porém sem ter capacidade de promover a repulsão elétrica entre as mesmas,

visto não possuir cargas. Isso sugere que a estabilização do sistema pelo tensoativo não iônico ocorre devido à formação de uma camada de hidratação do filme de tensoativo ao redor dos glóbulos de óleo da fase dispersa. Essa camada de água adsorvida ao redor das gotículas impede a aproximação das suas superfícies e a consequente coalescência da fase oleosa³⁷.

O doseamento da curcumina na formulação pelo método analítico espectrofotométrico foi de $101,63 \pm 0,78\%$ (Tempo 0). Ao comparar os resultados obtidos com métodos analíticos para determinação de curcumina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na literatura, o método espectrofotométrico proposto apresenta capacidade similar de determinar o analito em questão, uma vez que a faixa de linearidade do método desenvolvido pode ser considerada equivalente àquela dos métodos CLAE, utilizados para micropartículas poliméricas ($0,5$ a $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e nanoemulsão lipídica ($0,05$ - $4,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$)^{38, 39}. Sobre as análises de doseamento realizadas nos tempos de 30 e 60 dias de armazenamento a 40°C houve uma redução significativa do teor de curcumina ($p < 0,05$). Apesar de a diferença estatística indicar degradação da curcumina, pode-se perceber que a redução dos teores não foi superior a 10%, permitindo inferir que se for estabelecida uma especificação de teor de curcumina no produto entre 90-110%, o mesmo poderia ser considerado estável.

Os valores de pH da formulação durante o estudo de estabilidade variaram de 5,70 a 6,24, sendo a variação inferior a 0,50. Não houve diferença estatisticamente significativa para a densidade relativa da formulação durante o estudo de estabilidade ($p > 0,05$). Com relação ao tamanho das gotículas, houve diferença estatística somente no tempo de 60 dias ($p < 0,05$). O aumento do tamanho de gotículas após o armazenamento a 40°C pode ter ocasionado a coalescência dos glóbulos de óleo, causando, portanto, o aumento do tamanho das gotículas da fase dispersa. De modo complementar, percebe-se que a análise em 60 dias indicou também um maior valor de índice de polidispersividade, o que pode estar correlacionado da mesma forma ao fenômeno da coalescência anteriormente descrito.

A análise do perfil reológico da formulação e o coeficiente de viscosidade dinâmico são apresentados na figura 3.

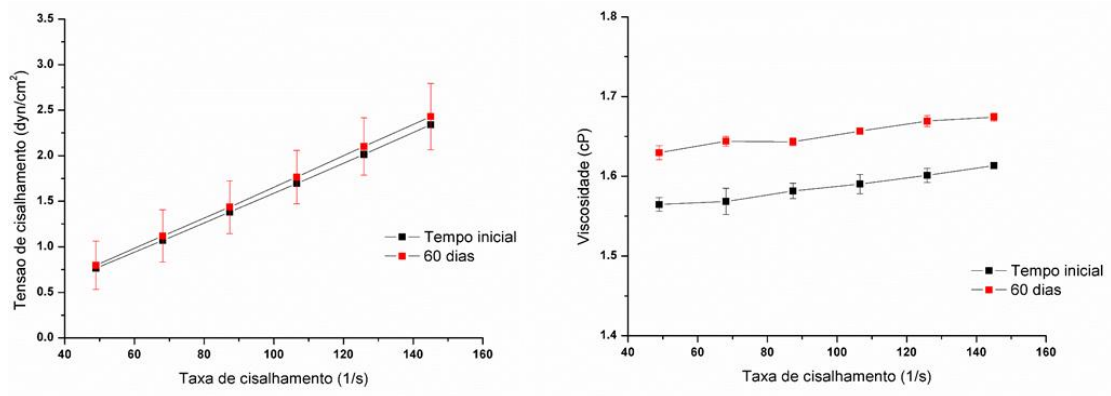


Figura 3: Comportamento reológico da formulação desenvolvida.

Os resultados mostram que a tensão de cisalhamento foi diretamente proporcional à taxa de cisalhamento ($r > 0,999$). Os coeficientes de viscosidade dinâmicos foram de $1,64 \pm 0,01$ cP e $1,70 \pm 0,01$ cP, para a formulação no tempo inicial e após 60 dias em condições aceleradas, respectivamente. A formulação apresentou viscosidade baixa, sem diferença estatística entre os tempos de armazenamento ($p = 0,5032$, teste t de Student). O aumento, embora não significativo, da viscosidade no tempo avaliado se deve a evaporação da água presente na formulação em temperatura extrema. A ME desenvolvida comportou-se como fluido newtoniano, sendo que neste caso, um resultado esperado⁴⁰. Os valores dos coeficientes de viscosidade dinâmicos foram baixos, e relativamente próximos ao valor da água. Com base nos resultados são esperados que a formulação apresentasse fácil espalhamento e escoamento.

Análise do perfil antimicrobiano das formulações farmacêuticas contendo curcumina in vitro.

Ao se comparar os grupos de análise na figura 4 é possível observar que houve diferença estatística entre todos os grupos comparados ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle (L-C-), com ênfase aos grupos que utilizaram o enxaguatório contendo curcumina L-C+; L+C+ (10'); L+C+ (30') a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figuras 4.E e 4.F). Esse dado é extremamente relevante, tendo em vista que foram selecionados para o estudo representantes de microrganismos gram positivo, gram negativo e fungo na forma de biofilme, mostrando que o tratamento é eficaz nesses representantes de microrganismos de interesse.

Para MRSA (Figura 4.A e 4.B) foi evidenciada uma redução nos grupos que utilizaram PDT com 10 e 30 minutos e curcumina a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($3,497 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ e $5,181 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ respectivamente). Ao se comparar os protocolos de PDT observa-se diferença estatística entre os grupos que receberam radiação de 10 e 30 minutos ($p < 0,05$), demonstrando que a radiação de 30 minutos foi mais eficaz na redução microbiana. No entanto, ao se comparar os grupos PDT com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e mesmo tempo de radiação não houve diferença significativa, o que evidencia que o efeito antimicrobiano sobre esta espécie não depende da concentração da curcumina e sim do tempo de radiação (Quanto maior o tempo de radiação, maior o efeito de morte microbiana). A alta redução de UFC.mL^{-1} , sobretudo para gram-positivas, corrobora com aqueles encontrados na literatura para estes e outros patógenos orais ⁴⁴⁻⁴⁶. Araujo et al ⁴⁶ estudou os efeitos da PDT em MRSA em cavidades ósseas associado à curcumina. Seus resultados mostraram que a curcumina fotoativada promoveu tanto a ruptura completa da estrutura do biofilme quanto redução de UFC.mL^{-1} , chegando à redução de $3,666 \log 10 \text{ CFU/mL}$ com apenas 5 minutos de radiação.

Para a *E. coli* (Figura 4.C e 4.D) foi evidenciada uma redução nos grupos que utilizaram PDT e curcumina $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nos tempos de 10 e 30 minutos ($5,6175 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ em ambos os tempos), o que equivale a 99,9% de morte microbiana em ambos os tempos de radiação. O mesmo ocorreu com a curcumina na concentração de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($4,134 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ e $3,96 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ respectivamente). É possível inferir que a concentração de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi mais eficaz na redução microbiana. No entanto, entre os grupos com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e mesmo tempo de radiação não houve diferença significativa ($p < 0,05$), o que evidencia que o efeito antimicrobiano independe do tempo de radiação e sim, da concentração do FS. Ou seja, para este patógeno, a maior eficiência antimicrobiana ocorre em concentrações mais baixas de curcumina.

Para a *C. albicans* (Figura 4.E e 4.F) observa-se uma redução significativa no grupo PDT com 30 minutos e curcumina a $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($3,497 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$, 89,4%). Ao se comparar os protocolos de PDT deste microrganismo, observa-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos que receberam radiação de 10 e 30 minutos e mesma concentração (L+C+ 10'; L+C+ 30'), o que evidencia que o efeito antimicrobiano sobre *C. albicans* depende tanto da concentração de curcumina quanto do tempo de radiação, com resultados superiores em maiores tempo de radiação e concentração de curcumina. Os resultados encontrados foram superiores aos encontrados na literatura, embora todos eles mostrarem redução significativa de UFC.mL^{-1} ⁴⁷⁻⁴⁹. Daliri et al ⁵⁰ mostraram que baixas concentrações

curcumina *in vitro* eram eficazes para a inativação de biofilmes de *C. albicans* quando associado com LED azul (460 nm). A redução, porém foi inferior a 2 log₁₀ UFC.mL⁻¹ -1 . Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Hsieh et al⁷² que realizou testes em PDT com curcumina a 80 µg.mL⁻¹ e 30 minutos de radiação, porém a redução do microrganismo aderido ao biofilme foi inferior a 20%. Os resultados dos testes microbiológicos se encontram nas figuras abaixo:

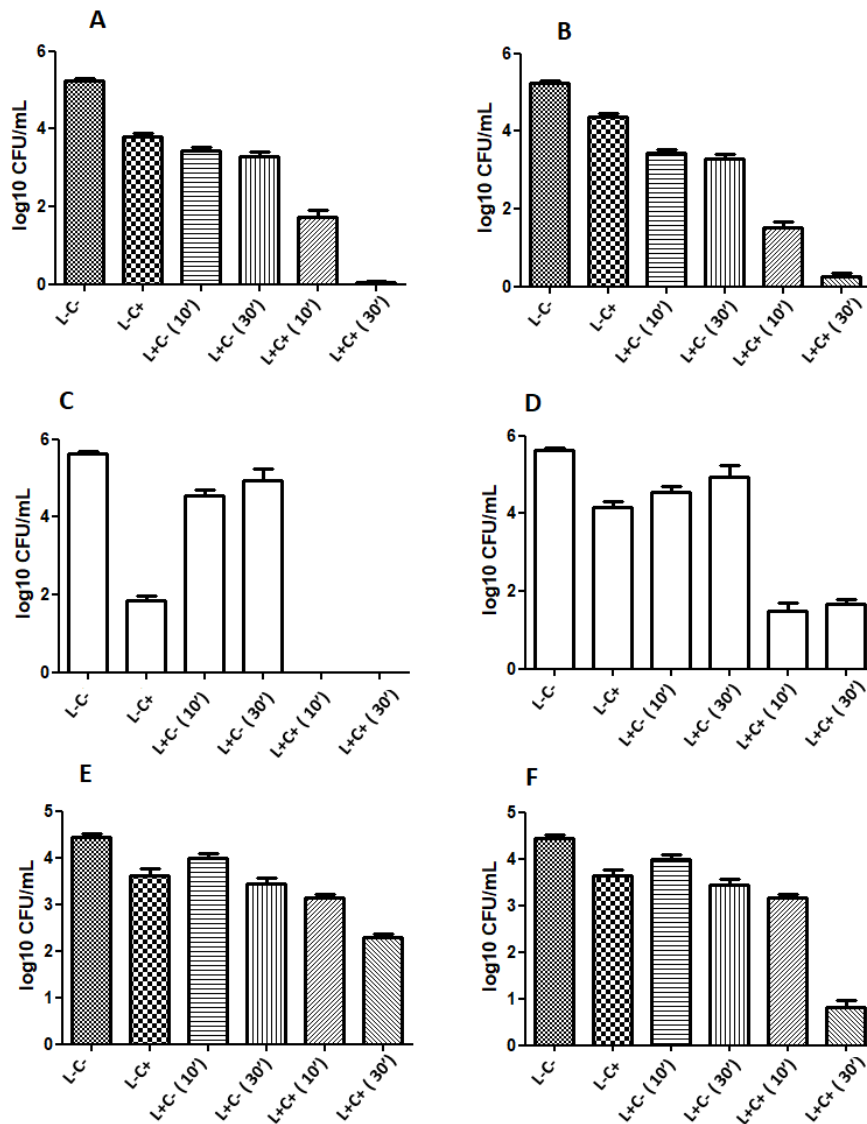


Figura 4. Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes microrganismos, utilizando enxaguatório microemulsionado contendo curcumina em diferentes concentrações e tempos de radiação. 12.A: MRSA com curcumina a 30 µg.mL⁻¹, 12.B: MRSA com curcumina a 60 µg.mL⁻¹; 12.C: *E. coli* com curcumina a 30 µg.mL⁻¹; 12.D: *E. coli* com curcumina a 60 µg.mL⁻¹; 12.E: *C. albicans* com curcumina a 30 µg.mL⁻¹; 12.F: *C. albicans* com curcumina a 60 µg.mL⁻¹. Controle: L-C-; Enxaguatório contendo curcumina: L-C+; Luz 10 minutos: L+C- (10'); Luz 30 minutos: L+C- (30'); PDT 10 minutos: L+C+ (10'); PDT 30 minutos: L+C+ (30'). Análise estatística ANOVA.

Em suma os resultados demonstram que a PDT pode suprimir de forma considerável a viabilidade de microrganismos gram-positivos, gram-negativos e fungos em cavidade oral, independentemente do estatus de resistência antibiótica que o microrganismo apresente [51,52]. Entre as técnicas disponíveis, o PDT tem sido uma das respostas mais bem sucedidas em pesquisa clínica^{53,54}.

Dentre os maiores percentuais de redução microbiana encontrada, a classe de gram-negativas, evidenciado pela *E. coli* teve a maior redução de UFC.mL⁻¹, seguido pelo MRSA (Gram-positiva) e *C. albicans* (fungo). Os resultados contrapõem alguns estudos em PDT com curcumina na literatura, que afirmam que microrganismos gram-positivos tendem a ter a maior redução, seguido de gram-negativas⁵⁷⁻⁶¹. Este fato pode ser explicado devido à presença de tensoativos na formulação desenvolvida, entre eles o Tween 80 (polissorbato 80), classificado como do tipo não iônico⁶². A presença de tensoativos na formulação pode diminuir a tensão interfacial entre óleo e água, rompendo as barreiras biológicas da célula alvo, entre elas o lipopolissacarídeos (LPS) em gram-negativas^{20,63-66}. Essas interações possivelmente ocorrem por interações apolares de cadeias alquílicas do lípideo A da LPS e dos tensoativos^{67,68}. Uma vez interagindo com a membrana, é possível remover a barreira adicional que, por sua vez, permite a maior penetração do FS e melhor ação bactericida dos radicais livres e oxigênio singlete gerados durante a fotoativação em PDT²⁰. Esse fato pode explicar a alta redução ocorrida para *E.coli*, na menor concentração de curcumina testada tanto em PDT (L+C+) quanto no grupo que não recebeu radiação LED (L-C+). Os mecanismos de ação do enxaguatório desenvolvido, porém, ainda precisam ser elucidados.

Em relação ao desenvolvimento de produtos nanotecnológicos para PDT, em um recente estudo, a curcumina foi encapsulada em nanopartículas poliméricas para aplicação em PDT⁶⁹. As formulações sintetizadas melhoraram a solubilidade em água da curcumina, no entanto apresentou maior efeito antimicrobiano fotodinâmica para culturas planctônicas do que para os biofilmes de *C. albicans* e MRSA⁶⁹. Os resultados contrapõem aqueles encontrados na presente pesquisa, que mostrou alta redução dos biofilmes, embora tenha sido desenvolvida uma microemulsão, nanotecnologia diferente do estudo apresentado.

A alta redução microbiana neste estudo pode ser explicada devido à curcumina estar encapsulada em gotículas nanométricas dispersas em um sistema microemulsionado do tipo óleo em água. O sistema de entrega de ME contribui para remoção mecânica da barreira adicional dos biofilmes formados, devido à presença de tensoativos e co-tensoativos na

formulação. Eles podem induzir pequenos distúrbios no lípido intercelular, permitindo o rompimento da matriz formada. Essas gotículas também são capazes de se dividir nos lipídios da célula microbiana, perturbando assim as estruturas e tornando-as mais permeáveis ao FS. Isso permite a melhor impregnação do FS na célula microbiana e, portanto, maior eficiência da PDT²⁰.

É possível inferir que a ME desenvolvido pode contribuir, inclusive, para descontaminação de cavidades orais em pacientes que sofrem de imunidade comprometida e patogenicidade de diversas infecções orais. Eles se beneficiarão da inativação fotodinâmica usando um sistema de entrega de ME^{70, 71}. Além disso, o ME carregado com curcumina no estudo precisou de uma baixa intensidade de luz e concentração do FS para atingir uma redução mínima de 2-log10 na população microbiana nos três microrganismos testados. Isso permite a adoção de protocolos terapêuticos com tempos de radiação e concentrações menores em pacientes com maior sensibilidade da mucosa oral sem, no entanto, comprometer a eficiência antimicrobiana.

Os resultados sugerem que o encapsulamento da curcumina em gotículas nanométricas no enxaguatório formulado permitiu contornar os seus obstáculos na utilização clínica: aumentou a sua compatibilidade com ambiente aquoso (predominante na cavidade oral), permitiu retardar a degradação química, aumentar a sua biodisponibilidade e melhorar a interação com as barreiras biológicas dos microrganismos durante a PDT⁷². Portanto, a abordagem baseada em ME desenvolvida tem a potencial de ser aplicado em estudos clínicos futuro, com baixa ou nenhuma toxicidade.

CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver um enxaguatório bucal com característica de microemulsão contendo curcumina para desinfecção de cavidades bucais associadas à PDT com os seguintes componentes: PEG 400, tween 80, óleo de linhaça, sorbitol, água e curcumina (mantendo a estabilidade do produto na faixa de concentração de 30 a 60 µg.mL⁻¹)

Foi obtido um produto final com os seguintes resultados físico-químicos: pH de 6,21 ± (0,036), densidade relativa de 1 ± 0,0003 g/ml, tamanho de gotículas de 13,86 ± 0,20 nm, índice de polidispersividade igual a 0,151 ± 0,0565, potencial zeta de -10,3 ± 2,6 (abaixo de 20mv em módulo devido a utilização de tensoativo não iônico, que garante a estabilidade

estérica do produto) e comportamento de fluxo newtoniano de baixa viscosidade $1,64 \pm 0,01$ cP.

O produto se mostrou estável fisicamente em armazenamento por 60 dias em estufa $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O método analítico desenvolvido para doseamento da curcumina na formulação desenvolvida se mostrou suficientemente linear, seletivo, preciso e exato. A concentração de curcumina doseada pelo método se mostrou dentro da faixa de (90-110 %), demonstrando que o mesmo pode ser armazenado sem degradação importante da curcumina.

As maiores reduções de UFC.mL^{-1} foi de $5,6175 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ no grupo L+C+ (10') e L+C+ (30'), ambos com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *E. coli*; $5,181 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ no grupo L+C+ (30') e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em MRSA; e $3,497 \log 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$ no grupo L+C+ (30'), $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso, CR, Passos D, Vieira J. 2017. Coompreendendo a cárie dental. Salusvita, bauru, v. 36, n. 4, p. 1153-1168,
2. Bal FA, ozkocak I, cadirci BH, karaarslan ES, cakdinleyen M, agaccioglu M. 2019. Effects of photodynamic therapy with indocyanine green on streptococcus mutans biofilm. Photodiagnosis photodyn ther. apr 6. Pii: s1572-1000(18)30344-2. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.005.
3. Eke, PI, dye, BA, wei, L. Update on prevalence of periodontitis in adults in the
4. Aimetti, M, Perotto, S, Castiglione, A, Mariani, GM, ferrarotti, F, Romano, F. 2015 Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in north italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. J clin periodontol ; 42: 622– 631; doi: 10.1902/jop.2017.170164.
5. Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, Tillberg A, Jönsson B. 2017. Periodontitis prevalence and severity in adults: a cross-sectional study in norwegian circumpolar communities. Journal of periodontology volume88, issue10. October. doi: 10.1902/jop.2017.170164
6. Groenewegen H , Bierman Wfw , Delli K , Dijkstra Pu , Nesse W , Vissink Um , Spijkervet Fkl periodontite grave é mais comum em hiv - pacientes infectados. J infect. 2019 mar; 78 (3): 171-177. Doi: 10.1016 / j.jinf.2018.11.008. Epub 06 de dezembro 2018. doi: 10.1016/j.jinf.2018.11.008

7. Sälzer S., Entalhe DE, Van Der Weijden FA, Dörfer Ce. Eficácia De Controle De Placa bacteriana Mecânica Interdental Na Gestão Gengivite- Uma Meta-Análise. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 (Supl. 16): S92-105. Doi: 10.1111/jcpe.12363
8. S Takenaka ,Ohsumi T 1 ,Noiri Y . 2018. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis.. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019 Nov; 55 (1): 33-40.. Epub 31 De Agosto. Doi: 10.1016 / J.Jdsr.2018.07.001
9. Duddi, N.; Mohan, T. N; Rajendran, R.; Sethumadhaya, M.; Hulimangla, M.; Roshni, S; Soham, G. 2014. .In Vitro Evaluation Of The Antimicrobial Efficacy Of Four Endodontic Biomaterials Against Enterococcus Faecalis, Candida Albicans, And Staphylococcus Aureus. *International Journal Of Biomaterials Volume (2014), Article Id 383756, 6 Pages.* doi: 10.1155/2014/383756
10. Al-Maweri Sa, Nassani Mz, Alaizari N, Kalakonda B, Al-Shamiri Hm5, Alhadj Mn, Al-Soneidar Wa7, Alahmary Aw. 2019. Efficacy Of Aloe Vera Mouthwash Versus Chlorhexidine On Plaque And Gingivitis: A Systematic Review. *Int J Dent Hyg.* Mar 4. Doi: 10.1111/Idh.12393.
11. Lizarelli RFZ, Freitas LM, Parmesano TN, Regalo SCH, Fontana CR, et al. (2017) Antimicrobial Photodynamic Therapy with Mouth Rinse for General Oral Disinfection. *J Ora Med Vol.1 No.1:4*
12. Markowitz K, Roberts E, Strickland M. 2019. Dental Products And Evidence-Based Dentistry. *Quintessence Int.*;50(5):402-411. Doi: 10.3290/J.Qi.A42293
13. Da Silva Mer, Danelon M, Santos Souza JA, Silva Df, Pereira JA, Pedrini D, De Camargo ER, Botazzo Delbem AC, Duque C. 2019. Incorporation Of Chlorhexidine And Nano-Sized Sodium Trimetaphosphate Into A Glass-Ionomer Cement: Effect On Mechanical And Microbiological Properties And Inhibition Of Enamel Demineralization. *J Dent.* Apr 3. Pii: S0300-5712(19)30061-2. Doi: 10.1016/J.Jdent.2019.04.001.
14. Osso D, Kanani N. 2013. Antiseptic Mouth Rinses: An Update On Comparative Effectiveness, Risks And Recommendations. *J Dent Hyg.*; 87
15. Pérez-Laguna V, Gilaberte Y, Millán-Lou MI, Agut M, Nonell S, Rezusta A, Hamblin MR. 2019. A Combination Of Photodynamic Therapy And Antimicrobial Compounds To Treat Skin And Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem Photobiol Sci.* Mar 1. Doi: 10.1039/C8pp00534f.
16. Jiang C , Wang H , Xia C , Dong Q , Chen E , Qiu O Y. , Su Y , Xie H , Zeng G , Kuang J , Ao De F, Gong X, J Li, Chen T. 2019 Um Estudo Duplo-Cego, Randomizado, Controlado Com Placebo De Probióticos Para Reduzir A Gravidade Da Via Oral Mucosite Induzida Por Radioquimioterapia Para Pacientes Com Carcinoma Da Nasofaringe. *Câncer Rev.* 01 De Abril; 125 (7): 1081-1090. Doi: 10.1002 / Cncr.31907.
17. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad. 2019. A Resistência Toward Clorexidina Em Bactérias Orais - Há Motivo De Preocupação?.*Frente Microbiol.* Marco 22; 10: 587. Doi: 10,3389 / Fmicb.2019.00587. Ecollection 2019. Revisão
18. Pérez-Laguna V, Gilaberte Y, Millán-Lou Mi, Agut M, Nonell S, Rezusta A, Hamblin Mr. A Combination Of Photodynamic Therapy And Antimicrobial Compounds To Treat Skin

And Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem Photobiol Sci.* 2019 Mar 1. Doi: 10.1039/C8pp00534f

19. Ianny AR; Rafaella LB, Karyna MM; Vanessa CJ, Yuri CW; Almeida LFD; Castroiv R; Cavalcantiv AL. 2014. Inhibitory Effect Of Mouthwashes On Lactobacilus Casei Growth. *Rev. Bras. Odontol.* Vol.69 No.1 Rio De Janeiro Jan./Jun.

20. Rocha MP, Rosa FCS And Rosa LP. 2017. Chemical And Biological Systems Of The Activity Oxygen Singlete In The Destruction Of Microbial Cells In Photodynamic Therapy. *Sm J Nanotechnol Nanomed.* 2(1): 1004.

21. Massimino, L. C; Yoshioka, S.A. 2014. Nanopartículas De Curcumina: Ftir E Solubilidade. *Ver Ciêncfarm Básica Apl.*, V35 Supl.1, Agosto.

22. Anvisa. Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, Volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010b

23. Brasil. Ministério Da Saúde. Anvisa. Resolução Re Nº 398, De 12 De Novembro De 2004. Determina A Publicação Do Guia Para A Realização De Estudos De Estabilidade. *Dou* 16 De Novembro De 2005.

24. Carvalho Ts, Lussi A. 2014. Efeito Combinado De Um Fluoride-, Stannous- E Quitosano Pasta De Dentes Contendo E Enxaguamento Contendo Estanho Na Prevenção Da Erosão Do Esmalte-Abrasão Inicial. *J Dent . Apr*; 42 (4): 450-9. Doi: 10.1016 / J.Jdent.2014.01.004.

25. Gutierrez TJK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina Ac. 2017. Encapsulation Of Curcumin In Polymeric Nanoparticles For Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Plos One.* Nov 6;12(11):E0187418. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0187418.

26. The United. States Pharmacopeia. The National Formulary. United States Pharmacopeial Convention. Rockville Md. 28 Ed. Washigton, Dc, 2004. Cd Version

27. British Pharmacopeia. 3. Ed. London: The Stationery Office, 1999. Cd Version

28. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. 2017 Microemulsion Utility In Pharmaceuticals: Implications For Multi-Drug Delivery. *Int J Pharm.* Jun 30;526(1-2):425-442. Doi: 10.1016/J.Ijpharm.2017.05.005.

29. Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS, Teixeira H. 2012. Nanoemulsões Como Sistemas De Liberação Parenteral De Fármacos. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 9, 1827-1840,

30. Subongkot T. 2019. Desenvolvimento E Estudo Mecanístico De Uma Microemulsão Contendo Vitamina E Tpgs Para O Aumento Da Absorção Oral De Celecoxib. *Int J Nanomedicine .* 30 De Abril; 14: 3087-3102. Doi: 10.2147 / Ijn.S201449.

31. Teochari I, Papadimitriou V, Papahatjis D, Assimomytis N, Pappou E, Id Hp, Id Ax, Pletsa V. 2018. Microemulsões Óleo-Em-Água Como Hospedeiros Para Compostos Citotóxicos Baseados Em Benzotiofeno: Uma Combinação Eficaz. *Biomimética (Basileia)* . 16 De Junho; 3 (2). Pii: E13. Doi: 10.3390

- 32.** Delgado AJ, Dias Ribeiro AP, Quesada A, Rodríguez LE, Hernández R, Wynkoop B, Dilbone DA. 2018. Efeito Potencial Erosivo De Enxaguatórios Bucais Sobre Esmalte E Dentina. *Gen Dent* . Maio-Junho; 66 (3): 75-79.
- 33.** Chowdhury CR, Shahnawaz K, Pd Kumari, Chowdhury A, Gootveld M, Lynch E. Valores De PH. 2018. Altamente Acídico De Bebidas Doces Carbonatadas, Sucos De Frutas, Águas Minerais E Níveis De Flúor Não Regulados Em Produtos De Higiene Bucal E Bebidas Na Índia: Uma Preocupação De Saúde Pública. *Perspectiva De Saúde Pública*. Jul 1: Doi: 10.1177 / 1757913918787218.
- 34.** Vivek HP, Prashant GM De, Geetha S, Chandramohan S De, Imranulla M, Srinidhi PB. 2018. Efeito De Mouthrinses Contendo Azeite, Flúor E Sua Combinação Na Erosão Do Esmalte : Um Estudo In Vitro. *J Contemp Dent Pract* . 1 De Fevereiro; 19 (2): 130-136.
- 35.** Laczkowski MS. 2014. Microencapsulação De Curcumina Com Maltodextrina, Avaliação Da Estabilidade E Aplicação Em Alimentos. *Vii Encontro De Produção Científica E Tecnológica*.
- 36.** Brasil Anvisa. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc Nº 166, 24/07/2017 . Guia Para Validação De Métodos Analíticos - Julho, 2017
- 37.** Aulton, Michael E. *Delineamento De Formas Farmacêuticas- 4 Ed-* Rio De Janeiro: Elsevier, 2016
- 38.** Freitas M, Reolon JB, Gomes GS, Haas SH, Bender EA, Colomé LM. 2015. Validação De Método Analítico Por Clae Para Quantificação De Aciclovir E Curcumina Em Micropartículas Poliméricas. *Anais Do Vii Salão Internacional De Ensino, Pesquisa E Extensão – Universidade Federal Do Pampa*. V. 7, N. 2. Salão De Pesquisa - Oral
- 39.** Nasr M, Abdel Rahman MH. 2019. Simultaneous Determination Of Curcumin And Resveratrol In Lipidic Nanoemulsion Formulation And Rat Plasma Using Hplc: Optimization And Application To Real Samples. *J Aoac Int*. Jan 16. Doi: 10.5740/Jaoacint.18-0269.
- 40.** Mouri A, Legrand P, El Ghzaoui A, Dorandeu C, Maurel JC, Devoisselle JM. 2016. Formulation Physicochemical Characterization And Stability Study Of Lithium-Loaded Microemulsionsystem. *Int J Pharm*. Apr 11;502(1-2):117-24. Doi: 10.1016/J.Ijpharm.2016.01.072.
- 41.** Germano,VE; Cindhi MRX; Mariana MS; Jales TVGA; Emanuelle LFL; Louise HR. 2018. Microrganismos Habitantes Da Cavidade Oral E Sua Relação Com Patologias Orais E Sistêmicas: Revisão De Literatura. *Rev. Nova Esperança*.; 16(2): 91-9
- 42.** Yu Jc 1 , Kho Dadadi H 2 , Baban B . 2019. A Imunidade Inata E Oral Microbiona: Uma Abordagem Personalizada, Preditiva E Preventiva Para A Gestão De Doenças Bucais . *Epma J*. Feb 25;10(1):43-50. Doi: 10.1007/S13167-019-00163-4.
- 43.** Blanko; Inada, N. M. ; Carbinatto, F. M. ; Bagnato, V. S. 2017 . Antimicrobial Efficacy Of Curcumin Formulations By Photodynamic Therapy. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology JCR*, V. 8, P. 506/511.

- 44.** Almeida, PP; Pereira, IS ; Rodrigues, KB ; Leal, LS ; Marques, AS ; LP ; Da Silva, FC ; Da Silva, RAA . 2017. Photodynamic Therapy Controls Of Staphylococcus Aureus Intradermal Infection In Mice. *Lasers In Medical Science JCR*, V. 32, P. 1337-1342.
- 45.** Araújo, TSD; Rodrigues, PLF; Santos, MS; De Oliveira, JM; Rosa, LP; Bagnato, VS; Blanco, KC; Da Silva, FC. 2018. Reduced Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Biofilm Formation In Bone Cavities By Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy JCR*, V. 21, P. 219-223.
- 46.** Da Silva Nr, Ribeiro Dg, Issa Jpm, Bonfá K, Menezes Ms, Oliveira Vc, De Souza Rf. Estudo Pré-Clínico De Um Protocolo De Terapia Fotodinâmica De Custo Eficaz Para O Tratamento De Candidoses Orais. *Lasers Med Sci* . 2017 Aug; 32 (6): 1253-1260. Doi: 10,1007 / S10103-017-2228-4. Epub 2017 15 De Maio
- 47.** Gong J, Parque H, Lee J, Seo H, Lee S. 2019. Efeito Da Terapia Fotodinâmica No Tratamento De Múltiplas Espécies Biofilmes, Incluindo Streptococcus Mutans , Lactobacillus Casei , E Cândida Albicans . *Photobiomodul Photomed Laser Surg* . Maio; 37 (5): 282-287. Doi: 10,1089 / Photob.2018.4571. Epub 2019 05 De Abril.
- 48.** Da Silva FC, Fernandes Rodrigues PL, Santos Dantas Araújo T, Sousa Santos M, De Oliveira JM, Pereira Rosa L, De Oliveira Santos GP, De Araújo BP, Bagnato VS. 2019. Espectroscopia De Fluorescência De Candida Albicans Biofilmes Em Cavidades Ósseas Tratadas Com Terapia Fotodinâmica Usando Led Azul (450 Nm) E Curcumina.. *Foto-Diagnóstico Photodyn Ther* . Maio 4. Pii: S1572-1000 (18) 30326-0. Doi: 10.1016 / J.Pdpdt.2019.05.002.
- 49.** Daliri F, Azizi A, Goudarzi M, Lawaf S, Rahimi A. 2019. In Vitro Comparison Of The Effect Of Photodynamic Therapy With Curcumin And Methylene Blue On Candida Albicans Colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Mar 23. Pii: S1572-1000(19)30007-9. Doi: 10.1016/J.Pdpdt.2019.03.017.
- 50.** Winkler K, Simon C, Finke M, Bleses K, Birke M, Szentmáry N, Hüttenberger D, Eppig T, Stachon T, Langenbucher A, Foth HJ, Herrmann M, Seitz B, Bischoff M. 2016. Photodynamic Inactivation Of Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus By Chlorin E6 And Red Light ($\lambda=670\text{nm}$). *J Photochem Photobiol B*. Sep;162:340-347. Doi: 10.1016/J.Jphotobiol.2016.07.007.
- 51.** Makdoui K, Hedin M, Bäckman A. 2019. Different Photodynamic Effects Of Blue Light With And Without Riboflavin On Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (Mrsa) And Human Keratinocytes In Vitro. *Lasers Med Sci*. Mar 30. Doi: 10.1007/S10103-019-02774-9.
- 52.** Abouelfetouh AA, Nafee NA, Moussa NK. 2016. The Degree Of Virulence Does Not Necessarily Affect Mrsa Biofilm Strength And Response To Photodynamic Therapy. *Microb Pathog*. Feb;91:54-60. Doi: 10.1016/J.Micpath.2015.11.012.
- 53.** Tseng Sp, Hung Wc, Chen Hj, Lin Yt, Jiang Hs, Chiu Hc, Hsueh Pr, Teng Lj, Tsai Jc. 2017. Effects Of Toluidine Blue O (Tbo)-Photodynamic Inactivation On Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolates. *J Microbiol Immunol Infect*. Feb;50(1):46-54. Doi: 10.1016/J.Jmii.2014.12.007.

54. Bumah VV, Masson-Meyers DS, Enwemeka CS. 2015. Blue 470nm Light Suppresses The Growth Of Salmonella Enterica And Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (Mrsa) In Vitro. *Lasers In Surgery And Medicine*, V. 45. P. 595–601. Doi: 10.1002/Lsm.22385
55. Gao Ss, Duangthip D, Wong Mcm, Lo Ecm, Chu Ch. 2019. Randomized Trial Of Silver Nitrate With Sodium Fluoride For Caries Arrest. *Jdr Clin Trans Res*. Apr;4(2):126-134. Doi: 10.1177/2380084418818482.
56. Leite, D. P. V.; Paolillo, F. R.; Panhóca, V. H; Ricci, H. A.; Fontana, C.; Bagnato V. S. 2014. Desinfecção Oral Com Terapia Fotodinâmica. In: *Xxiv Congresso Brasileiro De Engenharia Biomédica*. Anais. Uberlândia, Sp. Universidade Federal De Uberlândia.
57. Santezi C, Reina BD, Dovigo LN. 2018. Curcumin-Mediated Photodynamictherapy For The Treatment Of Oral Infections-A Review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Mar;21:409-415. Doi: 10.1016/J.Pdpdt.2018.01.016.
58. Ricci D, Hérica A ;Pratavieira, S ;Grecco, C ; Brugnera-Júnior, A ;Bagnato, VS; Kurachi, C . 2016. Clinical Comparison Of Two Photosensitizers For Oral Cavity Decontamination. *Photomedicine And Laser Surgery JCR*, V. Xx, P. 1-6.
59. Blanco, KC.; Inada, N. M. ; Bagnato, V. S. . Treatment Of Recurrent Pharyngotonsillitis By Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy (Print) JCR*, P. 1, 2017.
60. Inada, NM. ; Carbinatto, FM. ; Bagnato, VS. 2017. Antimicrobial Efficacy Of Curcumin Formulations By Photodynamic Therapy. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology JCR*, V. 8, P. 506/511..
61. Sieniawska E, Świątek Ł, Wota M, Rajtar B, Polz-Dacewicz M. 2019. Microemulsions Of Essentials Oils - Increase Of Solubility And Antioxidant Activity Or Cytotoxicity? *Food Chem Toxicol*. Apr 25;129:115-124. Doi: 10.1016/J.Fct.2019.04.038.
62. Rosa, FC. 2018. Terapia Fotodinâmica Total Da Boca Mediada Por Led Associado À Curcumina E Clorina Em Indivíduos Hiv Positivo E Com Aids: Análise Microbiológica, Impacto Tecidual Por Espectroscopia De Fluorescência E Microscopia Espectral. Tese Doutorado. Instituto De Física De São Carlos. Universidade De São Paulo
63. Nazar MF, Yasir Siddique M, Saleem MA, Zafar M, Nawaz F, Ashfaq M, Khan AM, Abd Ur Rahman HM, Tahir MB, Mat Lazim A. 2018. Fourth-Generation Antibiotic Gatifloxacin Encapsulated By Microemulsions: Structural And Probing Dynamics. *Langmuir*. Sep 11;34(36):10603-10612. Doi: 10.1021/Acs.Langmuir.8b01775. Epub 2018 Aug 28.
64. Sieniawska E, Świątek Ł, Wota M, Rajtar B, Polz-Dacewicz M. 2019. Microemulsions Of Essentials Oils - Increase Of Solubility And Antioxidant Activity Or Cytotoxicity? *Food Chem Toxicol*. Apr 25;129:115-124. Doi: 10.1016/J.Fct.2019.04.038.
65. Mitsou E, Kalogianni EP, Georgiou D, Stamatis H, Xenakis A, Zoumpantioti M. 2019. Formulation And Structural Study Of A Biocompatible Water-In-Oil Microemulsion As An Appropriate Enzyme Carrier: The Model Case Of Horseradish Peroxidase. *Langmuir*. Jan 8;35(1):150-160. Doi: 10.1021/Acs.Langmuir.8b03124.

- 66.** Teodorowicz M, Perdijk O, Verhoek I, Govers C, Savelkoul HF, Tang Y, Wichers H, Broersen K. 2017. Optimized Triton X-114 Assisted Lipopolysaccharide (Lps) Removal Method Reveals The Immunomodulatory Effect Of Food Proteins. *Plos One*. Mar 29;12(3):E0173778. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0173778.
- 67.** Van Belleghem JD, Merabishvili M, Vergauwen B, Lavigne R, Vaneechoutte M. 2017. A Comparative Study Of Different Strategies For Removal Of Endotoxins From Bacteriophage Preparations. *J Microbiol Methods*. Jan;132:153-159. Doi: 10.1016/J.Mimet.2016.11.020.
- 68.** Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui Mic; Sanitá PV, Pavarina AC, Barbugli PA, Mima Ego. 2017. Encapsulation Of Curcumin In Polymeric Nanoparticles For Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Plos One*. Nov 6;12(11):E0187418. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0187418.
- 69.** Bishackh, R.; Chi-Hsien,L; Liu, Wei Chi. 2016. Enhancement Of Photodynamic Inactivation Against *Pseudomonas Aeruginosa* By A Nano-Carrier Approach. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Apr 1;140:472-480. Doi: 10.1016
- 70.** Rout, B; Liu, H; Wu, WC. 2015. Photosensitizer In Lipid Nanoparticle: A Nano-Scaled Approach To Antibacterial Function. *Sci Rep*. 2017 Aug 11;7(1):7892. Doi: 10.1038/2017.08.018
- 71.** Hsieh YH, Zhang JH, Chuang WC, Yu KH, Huang XB, Lee YC, Lee CI. 2018. Study On The Effect Of Combined Treatment With Photodynamic And Chemical Therapies On *Candida Albicans*. *Int J Mol Sci*. Jan 24;19(2). Pii: E337. Doi: 10.3390/Ijms19020337.
- 72.** Silva J, Basso J, Sousa J, Fortuna A, Vitorino C. 2019. Development and full validation of an HPLC methodology to quantify atorvastatin and curcumin after their intranasal co-delivery to mice. *Biomed Chromatogr*. Jun 18:e4621. doi: 10.1002/bmc.4621.
- 73.** Chen Z, Quan L, Zhou H, Zhao Y, Chen P, Hu L, Yang Z, Hu C, Cao D. 2019. Screening of active fractions from *Curcuma Longa Radix* isolated by HPLC and GC-MS for promotion of blood circulation and relief of pain. *J Ethnopharmacol*. Apr 24;234:68-75. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.035.
- 74.** Rafeek R, Carrington CVF, Gomez A, D Harkins, Torralba H, Kuelbs C, Addae J, Gwen A, Nelson KE. Xilitol e sorbitol efeitos sobre o microbioma de saliva e placa. *J Oral Microbiol*. 2018 23 de outubro; 11 (1): 1536181. doi: 10.1080 / 20002297.2018.1536181. eCollection 2019.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível desenvolver um enxaguatório bucal com característica de microemulsão contendo curcumina para desinfecção de cavidades bucais associadas à PDT com os seguintes componentes: PEG 400, tween 80, óleo de linhaça, sorbitol, água e curcumina (mantendo a estabilidade física do produto na faixa de concentração de 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O produto também se mostrou estável fisicamente em armazenamento por 60 dias em estufa 40°C \pm 2°C sem degradação importante da curcumina,
- O enxaguatório microemulsionado contendo curcumina desenvolvido foi efetivo *in vitro* na aplicação em PDT antimicrobiana sobre biofilme de *C. albicans*, MRSA e *E. coli* com redução significativa de UFC/mL em todos os microrganismos testados.