

Depósito de Patente

Os resultados obtidos nesta dissertação resultaram no depósito do pedido de patente intitulado "FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSENSIBILIZADO", sob o Número do Processo BR 10 2024 026794 0, na categoria Patente de Invenção (PI).

A invenção desenvolve uma formulação antimicrobiana inovadora baseada em nanopartículas de azul de metileno fotosensibilizado incorporadas em matrizes de metilcelulose, obtidas por nanoprecipitação. O objetivo da tecnologia é oferecer uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções orais e microrganismos resistentes, proporcionando uma abordagem terapêutica mais segura e sustentável.

A relevância biomédica da formulação justifica sua proteção por patente, destacando-se pelo potencial de otimizar tratamentos antimicrobianos e reduzir a resistência bacteriana. O desenvolvimento desse sistema foi embasado nos achados apresentados nesta dissertação, demonstrando a aplicabilidade e inovação da tecnologia proposta.

Disponível em:

<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1759180&SearchParameter=BR%2010%202024%20026794%200%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>

BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais

Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI [Início | Ajuda?]

» Consultar por: Base Patentes | Finalizar Sessão 1/1

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: BR 10 2024 026794 0
(22) Data do Depósito: 19/12/2024
(43) Data da Publicação: -
(47) Data da Concessão: -

(71) Nome do Depositante: ANELISE VIAPIANA MASIERO (BR/SC) / CLEONICE GONÇALVES DA ROSA (BR/SC) / MAGALI PARIZZI (BR/SC) / MICHAEL RAMOS NUNES (BR/SC) / FUNDAÇÃO DAS ESCOLAS UNIDAS DO PLANALTO CATARINENSE (BR/SC)
(74) Nome do Procurador: ANEL MARCAS E PATENTES LTDA

Anuidades ?

Petições ?

Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data
Serviços							
200	✓	870240108711	19/12/2024	- - -	ANELISE VIAPIANA MASIERO		-

Anuidade
Outros

Publicações ?

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2817	31/12/2024	2.10	- -	Número de Protocolo '870240108711' em 19/12/2024 16:56 (WB)

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 026794 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 5

Nome ou Razão Social: ANELISE VIAPIANA MASIERO

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 92583555049

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: AV MARECHAL CASTELO BRANCO, 170 - BAIRRO
UNIVERSITÁRIO

Cidade: Lages

Estado: SC

CEP: 88509-900

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Depositante 2 de 5

Nome ou Razão Social: CLEONICE GONÇALVES DA ROSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 01094384003

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA ERNESTO GOSS, N° 100, AP 402 - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-165

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Depositante 3 de 5

Nome ou Razão Social: MAGALI PARIZZI

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 51392305934

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: RUA VIDAL RAMOS JÚNIOR, N° 110, APTO 132. ED.LEONARDO DA VINCI - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-120

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Depositante 4 de 5

Nome ou Razão Social: MICHAEL RAMOS NUNES

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 00180296043

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino profissional

Endereço: RUA ERNESTO GOSS, N° 100, AP 402 - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-165

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Depositante 5 de 5

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO DAS ESCOLAS UNIDAS DO PLANALTO
CATARINENSE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 84953579000105

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: AV MARECHAL CASTELO BRANCO, 170 – BAIRRO
UNIVERSITÁRIO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88509-900

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO

Resumo: a presente invenção refere-se ao uso de nanopartículas de azul de metileno em matrizes de metilcelulose em duas concentrações pelo método de nanoprecipitação, além de realizar a caracterização físico-química e morfológica quanto a eficiência de encapsulação, mensurar o tamanho de partícula, o índice de polidispersão, o potencial Zeta, a microscopia eletrônica de transmissão, a liberação controlada, biocompatibilidade e ação antimicrobiana.

Figura a publicar: FIG 2

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: SILVIO CAETANO

Numero OAB: 021073SC

Numero API: 1884

CPF/CNPJ: 02090577932

Endereço: Av. Hercílio Amante, 360 - Bairro Prospera

Cidade: Criciúma

Estado: SC

CEP: 88815-010

Telefone: (48) 3461-2525

Fax: (48) 3443-2001

Email: silvio@anelmarcas.com.br

Escritório:

Nome ou Razão Social: ANEL MARCAS E PATENTES LTDA

CPF/CNPJ: 04806259000185

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: ANELISE VIAPIANA MASIERO

CPF: 92583555049

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: AV MARECHAL CASTELO BRANCO, 170 - BAIRRO
UNIVERSITÁRIO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88509-900

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Inventor 2 de 4

Nome: CLEONICE GONÇALVES DA ROSA

CPF: 01094384003

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA ERNESTO GOSS, N° 100, AP 402 - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-165

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Inventor 3 de 4

Nome: MAGALI PARIZZI

CPF: 51392305934

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Odontólogo

Endereço: RUA VIDAL RAMOS JÚNIOR 110, APTO 132. ED.LEONARDO DA VINCI - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-120

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Inventor 4 de 4

Nome: MICHAEL RAMOS NUNES

CPF: 00180296043

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA ERNESTO GOSS, N° 100, AP 402 - BAIRRO CENTRO

Cidade: LAGES

Estado: SC

CEP: 88502-165

País: BRASIL

Telefone: (48) 346 12525

Fax:

Email: atendimento@anelmarcas.com.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Procuração	Procuração_Anelise_ass.pdf
Procuração	Procuração_Cleonice_ass.pdf
Procuração	Procuração_Magali_ass.pdf
Procuração	Procuração_Michael Nunes_ass.pdf
Procuração	Procuração_UNIPLAC_ass.pdf
Contrato Social	5 - Estatuto Social.pdf
Contrato Social	6 - Ata de eleição do quadro do dirigentes atual.pdf
Documento de Cessão	Cessão de direitos_FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO_ass.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante_anelise_pedido_patente_19dez24.pdf
Relatório Descritivo	descritivo FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO.pdf
Desenho	desenhos FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO.pdf
Reivindicação	reivindicações FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO.pdf
Resumo	resumo - FORMULAÇÃO DE ANTIMICROBIANO À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTSENSIBILIZADO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**UNIVERSIDADE DO PLANALTO CATARINENSE – UNIPLAC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E SAÚDE – PPGAS**

MAGALI PARIZZI

**NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSSENSIBILIZADAS PARA
APLICAÇÃO NA PERIODONTIA: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ANTIMICROBIANA**

LAGES – SC

2022

MAGALI PARIZZI

**NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSSENSIBILIZADAS PARA
APLICAÇÃO NA PERIODONTIA: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Saúde.

Orientadora: Profa Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero

Linha de pesquisa: Saúde, Ambiente e Sociedade

LAGES – SC

2022

Ficha Catalográfica

P231n Parizzi, Magali.
Nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas para aplicação na periodontia: avaliação físico-química e antimicrobiana/Magali Parizzi – Lages, SC, 2022.
63 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Planalto Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense.
Orientadora: Cleonice Gonçalves da Rosa
Coorientadora: Anelise Viapiana Masiero

1. Periodontia. 2. Doença periodontal. 3. Nanotecnologia. 4. Fototerapia . I. Rosa, Cleonice Gonçalves da. II. Masiero, Anelise Viapiana. III. Título.

CDD 617.632

Catálogo na Fonte: Biblioteca Central

Magali Parizzi

**NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSSENSIBILIZADAS
PARA APLICAÇÃO NA PERIODONTIA: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Saúde.

Aprovada em 16 de agosto de 2022.

Banca Examinadora:

Cleonice Gonçalves da Rosa
(Orientadora e Presidente da Banca Examinadora)

Anelise Viapiana Masiero
(Coorientadora)

Prof. Dr. Fernando Branco Barletta
(Examinador Titular Externo - PPGO/ULBRA/RS)

Profa. Dra. Bruna Fernanda da Silva
(Examinadora Titular Interna - PPGAS/UNIPLAC)

Cleonice Gonçalves da Rosa


Participação em projeto de Pesquisa 4032008



DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE

Declaro que os dados apresentados nesta versão da Dissertação para o Exame da Defesa de Dissertação são decorrentes de pesquisa própria e de revisão bibliográfica referenciada segundo normas científicas.

Lages, 10 de outubro de 2022.

A handwritten signature in blue ink that reads "Magali Parizzi". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Magali Parizzi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar minha vida e estar sempre presente nela.

Aos meus pais por ensinarem o caminho da educação, respeito, honestidade, perseverança, esperança e sobretudo do amor incondicional pelo que temos, pelo que fazemos e pelo que devemos fazer.

Aos meus filhos por todo amor, dedicação, carinho, apoio, paciência e auxílio de todos os dias.

A minha amiga e orientadora Professora Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa e a minha amiga e co-orientadora Professora Dra. Anelise Viapiana Masiero pela sua dedicação incansável na orientação deste trabalho e pela confiança, em mim depositada.

À banca examinadora pela disponibilidade e aceitação em participar da avaliação deste trabalho e pelas suas relevantes e importantes contribuições.

Aos professores do PPGAS pelos ensinamentos e orientações durante a minha formação.

Aos meus colegas do PPGAS pelo companheirismo e apoio durante o curso.

Aos editais da FAPESC (CP FAPESC 12/2020 N° Termo de Outorga: 2021TR001430 e CP FAPESC 15/2021-ACAFE - Termo de Outorga N°: 2021TR001220) e do Programa Uniedu (Bolsa de Iniciação Científica UNIEDU- Art. 170) pelo auxílio financeiro para aquisição de reagentes, materiais e bolsa de Iniciação Científica.

À UNIPLAC, IFSC e UFSC pela disponibilidade dos laboratórios para a realização deste estudo.

Ao Professor Michael Nunes pela sua disponibilidade e auxílio valiosos na efetivação das análises laboratoriais.

O meu muito obrigada a todos que de alguma forma participaram deste percurso com incentivo, dedicação e companheirismo.

RESUMO

A periodontite tem prevalência de 30 a 50% em nações industrializadas sendo considerada um importante problema de saúde pública em razão de ser um fator de risco para várias doenças sistêmicas. Neste contexto, novas terapias têm sido pesquisadas, mas resultados efetivos com protocolos adequados ainda estão em construção. Dentre elas destaca-se a entrega local de medicamentos por meio de diversos dispositivos, que facilitam a liberação dos mesmos no local desejado. Outra possibilidade é a terapia fotodinâmica com laser de baixa intensidade associado à fotossensibilizadores, que quando aliada a nanotecnologia tem registrado resultados promissores na supressão de microrganismos periodontais e na contenção da resistência bacteriana. Diante do exposto o presente estudo se propôs em sintetizar nanopartículas de azul de metileno em matrizes de metilcelulose e associá-lo à terapia fotodinâmica para aplicação na periodontia. O estudo se caracteriza por um estudo *in vitro*, e foi conduzido em duas etapas. Inicialmente foi realizada a síntese das nanopartículas de azul de metileno e sua respectiva caracterização físico-química quanto a eficiência de encapsulação, tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS), morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET), e liberação controlada do azul de metileno. Posteriormente, foram avaliadas: a ação antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno associada à terapia fotodinâmica frente aos principais microrganismos relacionados à periodontite: *Staphylococcus aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Cândida albicans*. As nanopartículas de azul de metileno apresentaram uma eficiência de encapsulação próximo a 100%, e os menores resultados de tamanho de partícula (186 e 274 nm) foram atribuídas as com menores concentrações de azul de metileno e metilcelulose na formulação. As amostras apresentaram uma liberação lenta e controlada ao longo das 10 horas avaliadas. As nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas apresentaram efetiva ação antimicrobiana contra os microrganismos estudados ao serem comparadas ao azul de metileno puro. Com base nestes resultados entende-se que este é um produto inovador e promissor para ser utilizado como adjuvante ao tratamento periodontal convencional e que pode diminuir a resistência antimicrobiana pela sua atuação local associado a PDT. Desta forma há viabilidade de obtenção de protocolos seguros, adequados, de fácil manuseio e de acessibilidade para todos, a fim de diminuir a resistência microbiana a antibióticos alopáticos e efetivar maiores taxas de sucesso nos tratamentos periodontais

Palavras-chave: Periodontia. Doença periodontal. Nanotecnologia. Fototerapia.

ABSTRACT

Periodontitis has a prevalence of 30 to 50% in industrialized nations and is considered an important public health problem because it is a risk factor for several systemic diseases. In this context, new therapies have been researched, but adequate protocols are still under. Among them can be highlighted the local delivery of medicines through various devices, which facilitate their release at the desired location. Another possibility is photodynamic therapy with low-level laser associated with photosensitizers. When combined with nanotechnology it has shown promising results in the suppression of periodontal microorganisms and in the containment of bacterial resistance. Thus, the present study aimed to synthesize methylene blue nanoparticles in methylcellulose matrices and associate it with photodynamic therapy for application in periodontics. This *in vitro* study was conducted in two stages. Initially, the synthesis of methylene blue nanoparticles was performed and the physicochemical properties related to encapsulation efficiency, particle size by dynamic light scattering (DLS), morphology by transmission electron microscopy (TEM), and controlled release of methylene blue were evaluated. In addition the antimicrobial activity of methylene blue nanoparticles associated with photodynamic therapy was evaluated against the main microorganisms related to periodontitis: *Staphylococcus aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. The methylene blue nanoparticles showed an encapsulation efficiency close to 100%, and the smallest particle size results (186 and 274 nm) were attributed to those with the lowest concentrations of methylene blue and methylcellulose in the formulation. The samples showed a slow and controlled release over the 10 hours evaluated. The photosensitized methylene blue nanoparticles showed effective antimicrobial activity against the microorganisms studied when compared to pure methylene blue. These results showed that this is an innovative and promising product to be used as an adjunct to conventional periodontal treatment and that it can reduce antimicrobial resistance due to its local action associated with PDT. Thus, it is possible to obtain safe, adequate, easy-to-handle and accessible protocols in order to reduce microbial resistance to allopathic antibiotics and to achieve higher success rates in periodontal treatments.

Keywords: Periodontics. Periodontal disease. Nanotechnology. Phototherapy

IMPACTO E CARÁTER INOVADOR DA PRODUÇÃO INTELECTUAL

A presente dissertação do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, está vinculada a linha de pesquisa Ambiente, Sociedade e Saúde e visa, a partir de um pensamento complexo e interdisciplinar constatar a relevância de como produtos inovadores podem impactar na saúde geral e na qualidade de vida dos indivíduos.

Esta pesquisa vincula-se a necessidade emergente, que a área da odontologia busca para evitar a ocorrência de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Neste contexto, efetuou-se um experimento, aliando a nanotecnologia com a terapia fotodinâmica com laser de baixa potência. Nosso estudo apresentou resultados promissores na supressão de bactérias e fungo.

A maior relevância desta pesquisa reside no fato de que a terapia fotodinâmica consegue atuar localmente na área afetada e, por esta razão, diminuir a ocorrência de resistência bacteriana, contribuindo também para preservar a saúde geral dos indivíduos

Ao realizar a pesquisa, de um novo produto para fazer frente as principais bactérias periodontais, pensou-se na importância do tema perante o cenário pandêmico que assola o mundo atual, pois é cada vez mais vital que o combate a cepas resistentes seja efetivo para o bem comum.

A utilização de nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno sob ação da terapia fotodinâmica é efetiva na supressão de bactérias periodontopatogênicas *in vitro*. Porém, mais pesquisas precisam ser efetivadas para que protocolos adequados, bem estruturados e de fácil manejo sejam ofertados, para que todos os profissionais da saúde possam utilizá-los rotineiramente, a fim de que se consiga combater a resistência antimicrobiana e, conseqüentemente, haja maior segurança e melhor qualidade de vida para todos.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AM	– Azul de metileno
BHI	– Agar Infusão Cérebro Coração, do inglês “Brain Heart Infusion”
DCNT	– Doença crônica não transmissível
DLS	– Espalhamento de luz dinâmico do inglês “ <i>Dynamic Light Scattering</i> ”
DP	– Doença periodontal
EE	– Eficiência de encapsulamento
Free MB	– <i>Free Methylene blue</i>
IFSC	– Instituto Federal de Santa Catarina
LASER	– Amplificação da luz por emissão estimulada de Radiação, do inglês “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”
LED	– Luz emitida por diodo
MB	– <i>Methylene blue</i>
MC	– Metilcelulose
MET	– Microscopia eletrônica de transmissão
PBS	– Solução salina de fosfato
PDT	– Terapia Fotodinâmica do inglês “ <i>Photodynamic Therapy</i> ”
pH	– Potencial hidrogênio
PLGA	– Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
RAR	– Raspagem e alisamento radicular
SFB	– Soro fetal bovino, do inglês “Fetal Bovine Serum”
SNC	– Sistema Nervoso Central
UFC	– Unidade formadora de colônia
UFSC	– Universidade Federal de Santa Catarina
UNIPLAC	– Universidade do Planalto Catarinense
UV-vis	– Ultravioleta visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem ilustrativa da fotossensibilização das amostras com laser de baixa potência	45
Figura 2 – Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão. a) Amostra 8- MC 0,001-Free MB; b) Amostra 9- MC 0,005-Free MB; c) Amostra 4-MC 0,001-MB 0,005 e d) Amostra 6-MC 0,005-MB 0,005	48
Figura 3 – Liberação controlada do azul de metileno em matrizes de metilcelulose	49
Figura 4 – Nanopartículas de azul de metileno e respectiva solução de azul de metileno a) 0,005% e b) 0,01%	53
Tabela 1 – Eficiência de encapsulação, Tamanho de partícula, Índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de azul de metileno carregadas com metilcelulose.....	46
Tabela 2 – Atividade antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	PERGUNTA DE PESQUISA	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	21
4.2	DOENÇAS SISTÊMICAS E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL.....	22
4.3	TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	26
4.4	SISTEMAS LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS	27
4.5	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	28
4.5.1	Laser de baixa intensidade	29
4.5.2	Azul de metileno	31
4.6	NANOTECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA.....	32
5	MANUSCRITO 1: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSENSIBILIZADAS PARA APLICAÇÃO NA PERIODONTIA	37
5.1	RESUMO.....	37
5.2	ABSTRACT.....	37
5.3	INTRODUÇÃO	38
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.4.1	Material	40
5.4.2	Síntese das nanopartículas de azul de metileno	40
5.4.3	Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas de azul de metileno	41
5.4.4	Avaliação antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno	43
5.4.5	Análise dos dados	45
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.5.1	Eficiência de encapsulação	46
5.5.2	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	47
5.5.3	Avaliação morfológica por met	48

5.5.4	Liberação controlada	49
5.5.5	Avaliação antimicrobiana	50
5.6	CONCLUSÃO	53
5.7	REFERÊNCIAS	54
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXO	63
	Anexo 1 – Capítulo de livro “O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associada a nanofotossensibilizantes no combate aos patógenos periodontais: uma revisão sistemática”	63

1 INTRODUÇÃO

O *Global Burden of Disease* classificou a periodontite grave em 11º lugar de prevalência, afetando 750 milhões de pessoas no mundo (GBD, 2017). Nazir *et al.* (2020) analisaram dados globais da doença periodontal que utilizaram o Índice periodontal comunitário de necessidades de tratamento em diversos países, onde a periodontite foi mais prevalente em pessoas idosas e em países de alta renda, provavelmente porque este retém mais dentes por mais tempo.

Os efeitos deletérios da periodontite se estendem além da cavidade oral através da circulação sanguínea, atingindo seu portador sistemicamente e contribuindo para o aumento das comorbidades sistêmicas (BUI *et al.*, 2019; DIOGUARDI 2020; MAROUF *et al.*, 2021; SEYAMA *et al.*, 2020).

A associação entre diabetes e doenças periodontais inflamatórias são estudadas há muito tempo e sua associação bidirecional está bem estabelecida na literatura (SEYAMA *et al.*, 2020), sendo a periodontite a sexta complicação mais comum do diabetes (DESHMUKH *et al.*, 2011). A inflamação causada pela infecção periodontal pode afetar adversamente o controle metabólico do diabetes. As bactérias gram-negativas podem interferir no controle glicêmico, pela sua atuação no metabolismo do fígado (SEYAMA *et al.*, 2020) e o tratamento da infecção oral pode ser efetivo neste controle (MEALEY, 2006).

Outra doença sistêmica que pode ter relação com a doença periodontal é o *Alzheimer* reconhecido por causar um declínio cognitivo progressivo e consequentemente diminuição da qualidade de vida de seu portador. Acredita-se que a doença periodontal poderia intensificar a inflamação no nível de sistema nervoso central (SNC) por citocinas inflamatórias de origem intraoral que chegam ao SNC através da corrente circulatória favorecendo o aparecimento da doença de *Alzheimer* (DIOGUARDI, 2020).

Ainda, a doença periodontal tem sido apontada como fator de risco para as doenças coronarianas (SANZ *et al.*, 2020), desenvolvimento de câncer de boca (YAO *et al.*, 2014), pneumonia nosocomial para pacientes internados em unidades de terapia intensiva (GOMES-FILHO *et al.*, 2014), risco aumentado de parto prematuro (LIN *et al.*, 2007) e maior risco de complicações da Covid -19 (MAROUF *et al.*, 2021).

O tratamento convencional da periodontite consiste na raspagem e alisamento radicular (FERREIRA *et al.*, 2018), os quais apresentam limitações, como dificuldade de acesso às áreas de furcas, bolsas profundas, sulcos e sítios distais de molares (TAKASAKI *et al.*, 2009) bem

como, as irregularidades e a anatomia do cimento e dentina radiculares também dificultam a remoção dos microrganismos (TRIBBLE; LAMONT, 2010).

A medicação sistêmica associada a esta terapia e às terapias cirúrgicas não têm atingido os resultados almejados (RAJESHWARI *et al.*, 2019). Isto ocorre devido a resistência bacteriana às medicações (MAHMOUDI *et al.*, 2018; TAN; SAFII; RAZALI 2020), seu uso inadequado, dificuldade de atingir o local, baixa concentração do medicamento ou por este ter pouca penetração tecidual (ADDY; MARTIN 2003). Ainda como causa de resistência bacteriana tem-se a utilização de antimicrobianos na veterinária e produção animal, os quais podem transmitir resistência ao organismo humano e animal (LOUREIRO *et al.*, 2016)

Com o objetivo de complementar o efeito destas terapias convencionais, novos tratamentos têm sido propostos (SANTANA *et al.*, 2016). No intuito de auxiliar no transporte das medicações surgiram os sistemas locais de administração de medicamentos para transportar as medicações ao local desejado (RAJESHWARI *et al.*, 2019; TAN; SAFII; RAZALI 2020; SILVESTRE *et al.*, 2021). Dentre estes sistemas destacam-se: sistemas de irrigação, fibras, géis, tiras, filmes, micropartículas, nanocápsulas, nanopartículas e agentes microbianos de baixa dose (RAJESHWARI *et al.*, 2019) além de dispositivos como fibra óptica (EDUARDO *et al.*, 2015; DE FREITAS *et al.*, 2015) lentes ópticas e cateteres (MANG, 2004).

Neste contexto, como terapia complementar ao tratamento convencional de raspagem e alisamento radicular, tem sido investigada, por meio de estudos *in vitro*, a terapia fotodinâmica comumente conhecida pela sua abreviatura da terminologia em inglês *photodynamic therapy* (PDT) (AZIZI *et al.*, 2019; FEKRAZAD *et al.*, 2015; FEKRAZAD *et al.*, 2016; MAHMOUDI *et al.*, 2018; MIRZAHOSSEINPOUR *et al.*, 2020) e também por meio de estudos *in vivo* (AIAHAMARI *et al.*, 2020; EDUARDO *et al.*, 2015; SURESH *et al.*, 2020). Sua utilização tem sido indicada principalmente devido ao seus efeitos de desinfecção local e modulação tecidual (AZIZI *et al.*, 2019; EDUARDO *et al.*, 2015) conseguindo reduzir fatores de virulência (KARAN *et al.*, 2017) e evitando a resistência bacteriana por agir em local específico (SILVESTRE *et al.*, 2021).

Consequentemente reduz tempo de tratamento e risco de bacteremias (AZIZI *et al.*, 2019). Ainda, os lasers de baixa potência utilizados na PDT, são reconhecidos pela ação analgésica, biomoduladora e anti-inflamatória (EDUARDO *et al.*, 2015).

Além da odontologia, a PDT tem sido usada na área médica para o tratamento coadjuvante do câncer (MANG, 2004), fotorejuvenescimento, lesões fúngicas, doenças de pele (BAPTISTA *et al.*, 2017; SHERWANI *et al.*, 2015).

Na perspectiva, de potencializar a ação das terapias complementares às áreas mais distantes das bolsas periodontais é que foi proposto este estudo, que associou a PDT a nanotecnologia para entregar um agente antibacteriano somente no local afetado na tentativa de se evitar a resistência bacteriana (AZIZI *et al.*, 2019).

A nanotecnologia tem sido usada com êxito na odontologia, na prevenção e tratamento da cárie e das doenças periodontais e na melhoria de vários produtos de diversas áreas, tais como dentística, prótese, implantodontia, periodontia, endodontia e cirurgia (ALKAHTANI, 2018).

Associada a terapia fotodinâmica observa-se estudos com os sensibilizantes azul de metileno e azul de toluidina associados a nanopartículas de ouro (SHERWANI *et al.*, 2015); com sensibilizador a base de nanopartículas de curcumina – sílica (MIRZAHOSSEINIPOUR *et al.*, 2020) azul de metileno nanoencapsulado com o copolímero poli (ácido lático) (PLGA) (CASTAÑEDA-GILL *et al.*, 2017; DE FREITAS *et al.*, 2016). Os resultados dos estudos acima referidos apontam que a associação da nanotecnologia potencializou a ação anticancerígena, antifúngica e antimicrobiana da PDT.

Diante do exposto, reitera-se que a PDT tem apresentado resultados promissores no combate às infecções periodontais. Entretanto, a maioria dos estudos ainda são estudos *in vitro*, que limitam extrapolar estes resultados, neste momento, para a prática clínica.

Assim, destaca-se a relevância deste estudo que desenvolveu nanopartículas de metilcelulose, contendo o corante de azul de metileno, para ser usado associado ao laser de baixa potência, no intuito de potencializar a ação antimicrobiana frente aos principais patógenos periodontais. A metilcelulose é um polímero de baixo custo, abundante na natureza, biocompatível, atóxico e inócuo ao meio ambiente. Nesse sentido, a interdisciplinaridade perpassa a temática do estudo uma vez que interrelaciona as ciências da saúde, do ambiente e da nanotecnologia que tem como objetivo comum aprimorar uma terapia complementar para o tratamento de pacientes com doença periodontal. Conseqüentemente, ao melhorar as condições de saúde oral, contribui-se para a melhoria da qualidade de vida relacionada à saúde bucal e das condições sistêmicas do paciente, reduzindo o risco de outras comorbidades como já apontado anteriormente.

Este tema apresenta relevância para os profissionais da saúde, principalmente para a odontologia. A doença periodontal é uma doença crônica que precisa ser tratada e mantida adequadamente, pois como já exposto ela é considerada um dos fatores de risco para algumas comorbidades sistêmicas. A busca por novas modalidades de tratamento periodontal é cada vez

mais evidente e necessária para que haja diminuição de resistência bacteriana e efetividade na remissão das bactérias periodontopatogênicas.

Como profissional especialista em periodontia há mais de 20 anos tenho observado a estreita relação que a doença periodontal tem com as condições sistêmicas dos indivíduos. Muitos diabéticos foram diagnosticados em consultas clínicas odontológicas e encaminhados para tratamento endócrino resultando em melhora de ambas as condições periodontal e clínica com os tratamentos aliados. Isto ocorre com outras comorbidades relacionadas com a baixa imunidade do paciente, como o estresse, fumo e pacientes com câncer. A saúde bucal tem relação direta com o corpo humano e precisa ser adequada e mantida pelos profissionais da área da saúde.

Como especialista em periodontia acompanhando pacientes ao longo dos anos tenho a percepção de que o tratamento mecânico convencional é efetivo na maioria dos casos em que o paciente faz a manutenção pessoal e comparece aos retornos para manutenção profissional da sua doença. Porém há casos, onde apesar de todos os esforços conjuntos para obtenção da saúde oral esta fica comprometida, quando há microrganismos resistentes ou quando a saúde geral é afetada. Assim, o cuidado interprofissional é essencial para que se atinja o bem estar do indivíduo.

Neste contexto a medicina tem contribuído para a aproximação com a odontologia devido ao entendimento mútuo das interrelações entre a cavidade oral e o corpo humano. Ainda a nanociência e a química são essenciais para a inovação de produtos nestas áreas. Sendo assim, novos tratamentos que possam melhorar as condições da saúde dos indivíduos devem ser pesquisados. Este estudo prioriza a busca de um tratamento local e inovador que tenha real efetividade no combate aos patógenos periodontais e menor agressividade ao indivíduo para que a saúde geral do mesmo seja mantida.

2 PERGUNTA DE PESQUISA

Como se apresentam as propriedades físico-químicas e antimicrobianas das nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas para aplicação na periodontia?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades físico-químicas e antimicrobianas das nanopartículas azul de metileno associado à terapia fotodinâmica para aplicação na periodontia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de azul de metileno;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas frente aos principais microrganismos relacionados a periodontite: *Staphylococcus aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Cândida albicans*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

A presente seção tem por propósito apresentar as características da doença periodontal e como esta pode ser um fator de risco para a saúde geral do indivíduo. Seu tratamento pode contribuir na prevenção ou redução do agravamento de algumas doenças sistêmicas. O tratamento mecânico da doença periodontal, apesar de ser bastante efetivo, nem sempre consegue atingir bactérias mais resistentes. Desta forma é importante que se investigue novas terapias para este fim. Dentre elas a terapia fotodinâmica com laser de baixa intensidade, associado a entrega de medicamentos local e a nanociência podem se configurar em aliados valiosos no tratamento periodontal contemporâneo.

4.1 DOENÇA PERIODONTAL

A periodontite é uma doença crônica não transmissível (DCNT) com alta prevalência, afeta gravemente cerca de 11,2 % da população mundial, sendo a sexta DCNT mais comum (SANZ *et al.*, 2019). É considerada um importante problema de saúde pública pois aumenta com a idade sendo mais prevalente em pessoas idosas (65 a 74 anos) e em países de alta renda (NAZIR *et al.*, 2020). A sua etiopatogenia tem causa microbiana e afeta os tecidos moles e de suporte dos dentes podendo causar mobilidade e esfoliação dentária (MOMBELLI, 2018; RAJESHWARI *et al.*, 2019). Ainda pode causar desmineralização das superfícies radiculares, amolecimento do cemento e contaminação por lipopolissacarídeos bacterianos (FERREIRA *et al.*, 2018).

Assim, para prevenir e tratar esta doença é essencial conhecer a patogênese das bactérias que se acumulam na bolsa periodontal (MOMBELLI, 2018). O acúmulo de bactérias no sulco gengival causa uma inflamação que é exacerbada à medida que a quantidade destes microrganismos aumenta (LÖE; THEILADE; JENSEN; 1965). Esta microbiota inicial é composta por cocos e bacilos gram positivos, com formas fusiformes e filamentosas com o seu aumento surgem as espiroquetas (THEILADE; WRIGHT; JENSEN; LÖE, 1966).

A doença periodontal tem microbiota muito diversificada com centenas de espécies e subespécies, associadas a alguns padrões de citocinas medidos no fluido gengival (MOMBELLI, 2018). Há cerca de 700 espécies diferentes de bactérias na cavidade oral sendo em torno de 400 delas encontradas em bolsas periodontais. Dentre os microrganismos mais usuais pode-se citar: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces comitans* (MOMBELLI, 2018).

A terapia profilática da doença periodontal é a remoção do biofilme bacteriano e de seus subprodutos para evitar o agravamento da mesma (MOMBELLI, 2018). O tratamento convencional que consiste na raspagem e alisamento radicular é o primeiro passo da terapia mecânica periodontal (FERREIRA *et al.*, 2018). Porém, este tratamento apresenta limitações, como dificuldade de acesso as áreas de furcas, bolsas profundas, sulcos e sítios distais de molares (BALATA *et al.*, 2010; TAKASAKI *et al.*, 2009) bem como, as irregularidades e a anatomia do cemento e dentina radiculares também dificultam a remoção dos microrganismos (TRIBBLE; LAMONT, 2010). Além disto, a lama dentinária e bactérias que permanecem viáveis dentro dos túbulos dentinários são considerados fatores limitantes da terapia convencional (FERREIRA *et al.*, 2018).

Outro agravante é que a infecção periodontal por ser lenta e contínua à medida que progride favorece o aumento da diversidade de flora bacteriana devido às interações complexas entre os microambientes (MOMBELLI, 2018). O desenvolvimento desta microbiota complexa depende de fatores ecológicos, mudanças intraorais que favorecem ou desencadeiam fatores de virulência (PRATTEN *et al.*, 2001).

Além disso, os patógenos periodontais permanecem em outros locais da cavidade oral, não somente na bolsa periodontal, principalmente se o microambiente tiver condições favoráveis tais como: ranhuras, tecidos moles aumentados, bolsa pericoronar em terceiros molares (MOMBELLI *et al.*, 1990) e; túbulos dentinários que também estão fora do alcance da terapia mecânica convencional (FERREIRA *et al.*, 2018). Nestas condições pode ocorrer recontaminação em sítios já tratados (MOMBELLI, 2018). Porém, com todas as dificuldades, esta terapia é indispensável e deve sempre ser realizada, principalmente para indivíduos com doenças sistêmicas, impossibilitados de serem tratados com terapias cirúrgicas, tais como diabéticos e portadores de doenças cardiovasculares (ROSE *et al.*, 2007).

A doença periodontal pode predispor os indivíduos a algumas doenças sistêmicas ou ser fator de risco para sua exacerbação. Diante disto é necessário conhecer como isto pode ocorrer.

4.2 DOENÇAS SISTÊMICAS E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA PERIODONTAL

Doenças periodontais podem predispor os indivíduos a algumas doenças sistêmicas, tais como: doenças cardiovasculares (SANZ *et al.*, 2019), aterosclerose (CAMPBELL *et al.*, 2015), aterotrombose (BAHEKAR *et al.*, 2007), infecção do trato respiratório, como pneumonia nosocomial (GOMES-FILHO *et al.*, 2014), Covid -19 (GOMES *et al.*, 2021; MAROUF *et al.*,

2021), *Alzheimer* (DIOGUARDI *et al.*, 2020) diabetes (DESHMUKH *et al.*, 2011; SEYAMA *et al.*, 2020), câncer bucal (YAO *et al.*, 2014).

Bui *et al.* (2019) correlacionaram patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* à várias doenças sistêmicas (cardiovasculares, gastrointestinais e colorretais, câncer, diabetes e resistência à insulina, doença de Alzheimer, infecções respiratórias e resultados adversos na gravidez). Desta forma, a inflamação oral pode afetar estas doenças devido aos subprodutos bacterianos oriundos da cavidade oral entrarem na circulação sanguínea podendo alterar o curso de outras comorbidades sistêmicas (BUI *et al.*, 2019).

A periodontite agressiva é um processo inflamatório de origem bacteriana mediada pelo sistema imunológico do hospedeiro (GARCIA, 2011). Apresenta destruição das estruturas de proteção e de suporte dentário, num período relativamente rápido, normalmente leva a perda prematura dos elementos dentários e em alguns casos a terapia antimicrobiana é necessária em adição à terapia mecânica (GARCIA, 2011).

Os biofilmes formam unidades complexas capazes de inibir os mecanismos da resposta de proteção inflamatória e imunológica do hospedeiro, impedindo-o de se proteger mesmo perante administração de antibióticos (ANDERSEN *et al.*, 2007). A antibioticoterapia realizada de forma indiscriminada ou inadequada pode causar resistência bacteriana (MAHMOUDI *et al.*, 2018; TAN; SAFII; RAZALI 2020). Sendo assim uma terapia de atuação local de combate a estes microrganismos, como a PDT com agentes fotossensibilizadores nanoparticulados pode evitar esta ocorrência (AZIZI *et al.*, 2019).

Os efeitos deletérios das doenças periodontais não ficam limitados à cavidade oral, mas se estendem pela circulação sanguínea atingindo o indivíduo sistemicamente, provocando uma resposta imunoinflamatória no hospedeiro que pode causar complicações sistêmicas (BUI *et al.*, 2019; SANZ *et al.*, 2019; TROIANO *et al.*, 2017).

A associação entre doenças cardiovasculares e doenças periodontais são cada vez mais evidentes (SANZ *et al.*, 2019). Bahekar *et al.* (2007) em estudo de meta análise de cinco estudos coorte prospectivos (86.092 pacientes), confirmam que tanto a prevalência quanto a incidência de doença coronariana aumentam significativamente em pacientes com doença periodontal quando comparados aos casos controle, indicando a doença periodontal (DP) como fator de risco de 1,14 vezes maior para ter a doença coronariana.

A aterosclerose e doença periodontal são doenças inflamatórias crônicas multifatoriais (CAMPBELL *et al.*, 2015). Os patógenos de bolsas periodontais podem atingir a vasculatura,

pela inflamação, e contribuir para a aterogênese, carregando bactérias patogênicas da doença periodontal, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CAMPBELL *et al.*, 2015).

Níveis elevados de mediadores inflamatórios que ocorrem na doença periodontal são forte indício no papel da aterotrombose que leva a doença cardiovascular (BAHEKAR *et al.*, 2007).

A periodontite e a placa bacteriana também podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de pneumonia nosocomial, cuja infecção respiratória pode ocorrer por microaspiração de secreções orofaríngeas colonizadas, aspiração do conteúdo gastroesofágico e inalação de aerossóis infectados (GOMES-FILHO *et al.*, 2014).

Marouf *et al.* (2021) avaliaram o impacto da periodontite na evolução da Covid - 19 em 568 pacientes, sugerindo que a periodontite pode ser um fator de risco para o aumento das complicações da Covid - 19. Avaliação de marcadores vinculados a piora do quadro da Covid - 19 como: o nível sanguíneo de glóbulos brancos , dímero D e proteína C reativa foram analisados por estes autores e o aumento destes marcadores em pacientes com doença periodontal pode ter levado a complicações da Covid como: admissão em unidades de terapia intensiva, maior assistência de ventilação e morte. Este estudo corrobora com outros já citados que a inflamação oral gera uma inflamação sistêmica capaz de alterar o mecanismo de defesa do indivíduo levando ao agravamento de outras enfermidades sistêmicas (DIOGUARDI *et al.*, 2020).

Gomes *et al.* (2021) analisaram o biofilme dental em 70 pacientes positivados para a Covid - 19 encontrando o vírus Sars Cov-2 no biofilme dental em 18,6% destes pacientes, constatação esta que apóia medidas de prevenção para evitar a disseminação deste vírus por via oral. Sendo este um assunto extremamente importante na pandemia que assola o nosso planeta e em conformidade com estes achados a promoção e prevenção da periodontite, bem como o seu tratamento e manutenção mostram-se vitais no combate a pandemia da Covid - 19.

Dioguardi *et al.* (2020) realizaram uma revisão sistemática com 1088 registros oriundos de estudos clínicos epidemiológicos e *in vitro* para avaliar se a doença periodontal e seus patógenos teriam influência na doença neurovegetativa de *Alzheimer*. Os resultados dos 15 estudos incluídos apontam que a doença periodontal pode intensificar a inflamação no nível do sistema nervoso central, por meio da inflamação gerada na cavidade oral, cujos patógenos periodontais ou citocinas, produzidas por estes, podem adentrar pela corrente sanguínea periférica e intensificar a inflamação no nível do sistema nervoso central. Desta forma pode favorecer a ocorrência do *Alzheimer* (DIOGUARDI *et al.*, 2020). Segundo esses autores, esta

doença causa um declínio cognitivo progressivo no portador levando a uma perda gradativa da sua qualidade de vida;

Bartold *et al.* (2010) investigaram o início e a gravidade da artrite experimental, induzindo lesão inflamatória com *Porphyromonas gingivalis* em roedores. Os autores evidenciaram uma relação entre a presença de inflamação periodontal por *Porphyromonas gingivalis* e o desenvolvimento de artrite reumatóide, por esta ter se desenvolvido mais rápido nos roedores induzidos pela inflamação dos *Porphyromonas gingivalis*.

A doença periodontal e o diabetes são doenças crônicas que necessitam de avaliações médicas frequentes, bem como reforços educacionais de cuidados à saúde consistentes o que contribui para o bem estar geral do indivíduo (MEALEY, 2006).

Mealey em 2006 já ressaltava que o diabetes estava relacionado ao agravamento, extensão e gravidade das doenças periodontais, gengivite e periodontite, apontando as reações inflamatórias das DP e do diabetes como componente importante para a patogênese destas doenças. Ainda, o autor destaca a correlação entre elas, ou seja, um bom controle glicêmico melhoraria as condições periodontais e o contrário também seria verdadeiro (MEALEY, 2006).

Esta correlação é corroborada por Deshmukh *et al.* (2011) onde relatam que a periodontite é considerada a sexta complicação mais comum do diabetes e que existe um relacionamento bidirecional em que a doença periodontal tem um impacto adverso no controle glicêmico e por sua vez o diabetes exacerba a infecção periodontal afetando a saúde geral do indivíduo.

Um estudo recente em camundongos verificou que as proteínas de carga das partículas nanométricas derivadas da membrana externa das vesículas da bactéria oral *Porphyromonas gingivalis*, quando translocadas até o fígado destes animais alteram seu metabolismo, culminando em aumento do Diabetes Mellitus (SEYAMA *et al.*, 2020). Sendo esta bactéria um dos principais microrganismos patogênicos da doença periodontal este estudo corrobora a questão de que a doença periodontal é um fator de risco para doenças sistêmicas, uma vez que estas proteínas avaliadas, neste estudo, estão presentes nas bactérias gram negativas que são os principais patógenos das doenças periodontais (SEYAMA *et al.*, 2020).

Outra associação da DP com doenças sistêmicas foi encontrada por meio de estudo de meta análise cujos achados sustentam que pacientes com doença periodontal aumentaram a suscetibilidade ao câncer de boca (YAO *et al.*, 2014).

A periodontite deve ser tratada adequadamente pois é fator de risco para algumas doenças sistêmicas. Desta forma o tratamento de enfermidades sistêmicas e orais é necessário para obtenção da saúde geral dos indivíduos

4.3 TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

O tratamento da doença periodontal tem por objetivo eliminar os agentes etiológicos da doença e restaurar a saúde do periodonto (MOMBELLI, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2017). O tratamento convencional ou não cirúrgico da doença periodontal inclui medidas de educação em prevenção, instrução de higiene bucal, instrumentação periodontal com instrumentos sônicos ou ultrassônicos e com instrumentos manuais e agentes quimioterápicos para prevenir e tratar a doença periodontal (ROSE *et al.*, 2007).

A orientação na prevenção e higiene bucal é essencial para que o próprio indivíduo mantenha sua saúde oral assim como a manutenção clínica profissional também é imprescindível para o gerenciamento e controle da doença periodontal (ROSE *et al.*, 2007).

A instrumentação periodontal pela raspagem e o alisamento radicular (RAR) é o primeiro passo da terapia mecânica periodontal (FERREIRA *et al.*, 2018). Após raspagem e alisamento radicular ocorre uma diminuição nos níveis de espiroquetas, microrganismos móveis e de patógenos periodontais específicos como *Porphorymonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatybacter actinomycetemcomitans*, assim como as espécies de *Bacteróides* (DOUNGUDOMDACHA *et al.*, 2001). Apesar deste tratamento ser realizado, sistematicamente, em todos os indivíduos portadores de doença periodontal (LINDHE *et al.*, 2011), não é raro encontrar cálculo e outras impurezas na superfície dental, mesmo após a realização de raspagem e alisamento radicular por profissionais experientes devido as dificuldades da sua remoção em algumas áreas como furcas, sulcos mais profundos, linhas de transição, junção cimento esmalte e concavidades radiculares (MOMBELLI *et al.*, 1990).

Outra dificuldade é que os túbulos dentinários abrigam bactérias viáveis em suas lacunas e irregularidades e a lama dentinária também limitam o sucesso do tratamento convencional (FERREIRA *et al.*, 2018). Além disso, alguns periodontopatógenos invadem os tecidos moles do periodonto impedindo a sua remoção pelo debridamento mecânico o que pode resultar em recontaminação de sítios já tratados (MOMBELLI, 2018).

Todos estes procedimentos são necessários para diminuir o número de microrganismos e a inflamação para criar um ambiente propício para a saúde dos tecidos periodontais e diminuir a probabilidade de progressão da doença (ROSE *et al.*, 2007).

Em indivíduos tratados com a terapia mecânica convencional que não conseguem uma remissão adequada da doença são utilizados agentes quimioterápicos para tentar coibir o avanço da mesma (ROSE *et al.*, 2007). Porém os microrganismos podem desenvolver resistência contra

uma variedade de agentes antimicrobianos (MAHMOUDI *et al.*, 2018; TAN; SAFI; RAZALI, 2020) devido ao seu uso indiscriminado, dificuldade de atingir o local, baixa concentração do medicamento ou por ter pouca penetração tecidual (ADDY; MARTIN 2003).

A entrega de medicamento local é uma modalidade de tratamento que emprega agentes quimioterápicos utilizando diferentes dispositivos como carreadores destes agentes para conseguir levá-los até áreas mais distantes inatingíveis com sua formulação original (RAJESHWARI *et al.*, 2019; TAN; SAFII; RAZALI 2020). Uma forma de evitar o desenvolvimento futuro de resistência bacteriana é se concentrar em compostos cujo mecanismo de ação interage com vários alvos no local patogênico (SILVESTRE *et al.*, 2021).

Neste contexto a terapia fotodinâmica com agentes fotossensibilizantes é uma excelente opção por atuar em vários locais biomoleculares (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) no alvo patogênico oferecendo locais de ação múltiplos e variáveis que conseguem inibir o desenvolvimento de resistência bacteriana aos próprios agentes fazendo desta terapia uma forma eficaz e segura de combate à bactérias, fungos, vírus e protozoários (SILVESTRE *et al.*, 2021). Além disto a PDT com sensibilizadores consegue atingir locais inacessíveis pelos instrumentos periodontais (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A nanociência favorece ainda mais estas estratégias para que se obtenha maior êxito na entrega local destes quimioterápicos (ALKATANI, 2018) e maior eficácia no tratamento com a PDT sem haver risco de provocar resistência bacteriana (SILVESTRE *et al.*, 2021).

4.4 SISTEMAS LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS

Com o objetivo de complementar o efeito das terapias convencionais da doença periodontal, tratamentos complementares tem sido propostos (SANTANA *et al.*, 2016). No intuito de auxiliar no transporte das medicações surgiram os sistemas locais de administração de medicamentos para transportar as medicações ao local desejado (RAJESHWARI *et al.*, 2019; TAN; SAFII; RAZALI, 2020; SILVESTRE *et al.*, 2021). Dentre estes sistemas destacam-se: sistemas de irrigação, fibras, géis, tiras, filmes, micropartículas, nanopartículas, agentes microbianos de baixa dose (RAJESHWARI *et al.*, 2019), ácido hialurônico, clorexidina, metronidazol, minociclina (TAN; SAFFI; RAZALI, 2020) e utensílios como fibra óptica (EDUARDO *et al.*, 2015), lentes ópticas, cateteres de balão e fibras cilíndricas (MANG, 2004).

Um sistema local de administração de medicamentos ideal deve ser fácil de administrar, liberar o agente de forma controlada, manter sua concentração por período prolongado, ser biodegradável, ser biocompatível e não irritar os tecidos (JOSHI *et al.*, 2016).

Escolher a via de administração adequada, a dose e a quantidade corretamente melhora o desempenho clínico da terapia periodontal (RAJESHWARI *et al.*, 2019), assim como a escolha do agente antimicrobiano é importante (JOSHI *et al.*, 2016).

Smiley *et al.* (2015) realizaram uma revisão sistemática bastante abrangente sobre entrega de medicamentos local e observaram que os melhores resultados para ganho de nível clínico de inserção, com resultados permanentes até 6 meses ou mais, foram através de gel de doxiciclina e a terapia fotodinâmica com laser diodo.

Uma das dificuldades das medicações entregues no local é a rapidez com que ocorre a substituição do fluido crevicular gengival no interior do sulco gengival, pois este fluxo pode impedir a penetração de substâncias antimicrobianas nestes locais, principalmente em sítios com bolsas periodontais de 4 a 5 mm que podem ter a renovação do fluido gengival cerca de 50 vezes por hora (GOODSON, 2003).

A maior parte destes produtos de entrega local possuem ação antimicrobiana e atuam como auxiliares para as demais terapias periodontais, principalmente em pacientes onde a terapia cirúrgica não é aplicável demonstrando diferença positiva quando aliados ao tratamento mecânico isolado (RAJESHWARI *et al.*, 2019; TAN; SAFFI; RAZALI, 2020).

A PDT atua como terapia auxiliar na entrega de medicamentos locais por utilizar substâncias fotossensibilizantes para desinfecção local.

4.5 TERAPIA FOTODINÂMICA

Para complementar a ação do tratamento convencional periodontal e dos dispositivos de entrega locais outra opção é a terapia fotodinâmica (PDT) (TAN; SAFFI; RAZALI, 2020) a qual tem sido investigada por meio de estudos *in vitro* (ALKAHTANI, 2018; AZIZI *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018; FEKRAZAD *et al.*, 2015; FEKRAZAD *et al.*, 2016; MAHMOUDI *et al.*, 2018; SHERWANI *et al.*, 2015; MIRZAHOSSEINPOUR *et al.*, 2020) e *in vivo* (AIAHAMARI *et al.*, 2020; MAHMOUDI *et al.*, 2018; SURESH *et al.*, 2020). Sua utilização tem sido indicada por não induzir resistência bacteriana, promover a redução microbiana com mínimos efeitos colaterais e sistêmicos (AZIZI *et al.*, 2019), reduzir microrganismos em infecções resistentes, ter baixo custo e acessibilidade (EDUARDO *et al.*,

2015) e propiciar conforto do paciente por diminuir a necessidade de retalhos cirúrgicos para tratamento de locais de difícil acesso (EDUARDO *et al.*, 2015).

Consequentemente reduz tempo de tratamento e bacteremias (SILVESTRE *et al.*, 2021). Ainda os lasers de baixa intensidade, utilizados na PDT são reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e antiinflamatória sobre tecidos moles e duros, e por restabelecer o equilíbrio biológico celular e a vitalidade tecidual (EDUARDO *et al.*, 2015).

As reações oxidativas fotossensibilizadoras do tipo I e tipo II tem o oxigênio como reagente. Sensibilizadores do tipo I passam por transferência de elétrons fotoinduzida e os do tipo II, como formação sensibilizada de oxigênio singleto (BAPTISTA *et al.*, 2017). A reação oxidativa fotossensibilizadora do tipo II é o mecanismo dominante da PDT (BAPTISTA *et al.*, 2017).

Estas reações atuam em sensibilizadores endógenos e exógenos e quando usados em PDT atuam como coadjuvantes em tratamentos de doenças de pele, tumores (MANG, 2004), na inativação de bactérias e fungos (BAPTISTA *et al.*, 2017; EDUARDO *et al.*, 2015) e na doença periodontal (ALKAHTANI, 2018; BIASI *et al.*, 2019; DE FREITAS *et al.*, 2016; EDUARDO *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016).

A PDT torna-se interessante por ser um tratamento local cujo mecanismo de ação ocorre através de uma substância fotossensibilizadora que ao interagir com a luz do laser e o oxigênio gera reações químicas liberando radicais livres ou oxigênio singleto, que culminam na morte celular (MIRZAHOSSEINPOUR *et al.*, 2020), fazendo a desinfecção das regiões contaminadas (MAHMOUDI *et al.*, 2018) sem causar resistência microbiana (AZIZI *et al.*, 2019; EDUARDO *et al.*, 2015). A PDT com laser de diodo luminoso e os fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina e indocianina verde têm demonstrado efetividade em estudos, *in vitro* e *in vivo*, contra bactérias periodontopatogênicas, sendo uma boa perspectiva para o tratamento local de infecções bacterianas (DE FREITAS *et al.*, 2016; MAHMOUDI *et al.*, 2018).

4.5.1 Laser de baixa intensidade

A fonte de luz da terapia fotodinâmica é obtida por LEDs (luz emitida por diodos) ou por LASER (acrônimo em inglês: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Os LEDs são mais usados na ativação de fotossensibilizadores administrados topicamente, onde não há necessidade de maior penetração da luz, já os lasers são preferidos quando se quer obter melhor foco e penetração local (MANG, 2004).

O laser de baixa intensidade é utilizado há mais de 30 anos e tem várias publicações científicas na literatura, demonstrando efeitos clínicos positivos (ANDRADE *et al.*, 2014; DE FREITAS *et al.*, 2016; EDUARDO *et al.*, 2015; SURESH *et al.*, 2015).

A terapia fotodinâmica utilizando laser de baixa intensidade é utilizada como adjuvante para o tratamento de infecções bucais localizadas e para tratamentos convencionais, principalmente em casos de microrganismos resistentes (EDUARDO *et al.*, 2015).

A utilização da PDT com laser de baixa intensidade além de ser minimamente invasivo é seletivamente retido por tecidos doentes, sem interferir nos tecidos normais (MANG, 2004). O laser de baixa intensidade atua na diminuição da hipóxia local e da inflamação e aumenta a produção de colágeno, atividade enzimática e circulação linfática e ainda reduz a dor pela ativação de fotoreceptores dentro da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (SURESH *et al.*, 2015).

A eficácia do protocolo do laser de baixa intensidade usado pode ser influenciada pelo comprimento de onda, duração e local de aplicação (SURESH *et al.*, 2015), quantidade de luz fornecida e absorvida pelos tecidos por meio da ativação do laser na substância fotossensibilizante da entrega da luz, que deve ser homogênea e atingir todo o volume do tecido alvo, para que se obtenha o efeito terapêutico desejado (MANG, 2004).

O laser de baixa intensidade é um aparelho que possui luz monocromática, coerente e de feixe colimado, utilizando potência variável de 50 a 500 mW e comprimento de onda próximos do espectro eletromagnético do vermelho e infravermelho de 630 a 980nm, cuja emissão de onda pode ser pulsada ou contínua (SURESH *et al.*, 2015). Como norma de segurança, o manuseio dos lasers de baixa intensidade deve ser realizado com óculos de proteção adequados para o paciente, operador e auxiliar, pois o feixe de luz emitido pelo laser pode afetar a retina (SURESH *et al.*, 2015).

O laser de baixa intensidade tem auxiliado no tratamento de processos inflamatórios devido a sua capacidade de imunomodulação dos tecidos (ANDRADE *et al.*, 2014; EDUARDO *et al.*, 2015). Eles possuem efeito terapêutico, promovendo o reparo tecidual, modulação da inflamação e analgesia (EDUARDO *et al.*, 2015).

O laser de baixa intensidade é aplicado em várias áreas da medicina (MANG, 2004) e da odontologia (ANDRADE *et al.*, 2014; ALKAHTANI 2018; BALATA *et al.*, 2010; BIASI *et al.*, 2019; DE FREITAS *et al.*, 2016; EDUARDO *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016). Na periodontia atua promovendo cicatrização de feridas e redução da dor em procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos (EDUARDO *et al.*, 2015; SURESH *et al.*, 2015) tendo boa aceitação

em tratamentos periodontais, inclusive sobre herpes e candidíase (ANDRADE *et al.*, 2014; EDUARDO *et al.*, 2015)

Diversos estudos clínicos comprovam que o uso do laser atua como coadjuvante na melhora da resposta inflamatória em diferentes situações clínicas como na raspagem subgingival e na reparação de cirurgias periodontais (ANDRADE *et al.*, 2014; SURESH *et al.*, 2015).

Outra grande vantagem do laser são seus dispositivos auxiliares. É possível acoplar uma fibra óptica ao aparelho, o que permite a entrega de fótons no alvo específico, otimizando sua capacidade terapêutica (EDUARDO *et al.*, 2015; MANG, 2004). O dispositivo de fibra óptica é utilizado na PDT com substância fotossensibilizadora em carcinomas de células escamosas orais recorrentes, e para exames em pulmão e esôfago (MANG, 2004). Na odontologia a fibra óptica é introduzida em bolsas periodontais, fístulas e canais radiculares (EDUARDO *et al.*, 2015) e em biofilmes *in vitro* (DE FREITAS *et al.*, 2016). Ainda, a PDT é utilizada em oncologia, com outros dispositivos, tais como cateteres de balão e fibras cilíndricas (MANG, 2004).

O laser de baixa potência só tem efeito de desinfecção local quando utilizado na PDT com substâncias fotossensibilizadoras. O azul de metileno é um fármaco hidrofílico que atua como fotossensibilizante.

4.5.2 Azul de metileno

Para combater a placa bacteriana agentes antibacterianos químicos têm sido usados de forma profilática e terapêutica (WILSON, 1994). Para o tratamento de infecções bucais, os derivados de fenotiazinas, azul de metileno e azul de toluidina foram os fármacos fotossensibilizadores mais estudados na literatura (LONGO; AZEVEDO, 2010). O azul de metileno (MB) é uma das principais substâncias antimicrobianas, que possui um alto grau de seletividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas, e na maioria das vezes é utilizado durante a terapia fotodinâmica (SANTIN *et al.*, 2014) como fotossensibilizador exógeno antropogênico que origina produtos de oxigenação e de foto oxidação, capazes de causar morte celular (BAPTISTA *et al.*, 2017).

O azul de metileno tem absorção máxima em 664nm, devendo ser utilizado para PDT com fontes de luz emitindo fótons na faixa do vermelho visível, como os lasers de baixa potência e os LEDs vermelhos (HARRIS *et al.*, 2005). O azul de metileno acumula-se, principalmente, na mitocôndria das células, que possuem proteínas na sua membrana e é mais

atraído quando tem carga positiva devido ao ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (BAPTISTA *et al.*, 2004).

As substâncias fotossensibilizadoras tem um tempo de pré-irradiação, que é o tempo que elas devem ficar no local alvo, antes de serem irradiadas, para que atinjam seu alvo e, as espécies reativas de oxigênio sejam liberadas (BAGNATO, 2019). Em infecções periodontais o tempo de pré-irradiação do azul de metileno é de 5 minutos (RIBEIRO *et al.*, 2005), em lesões fúngicas é de 30 min (MIMA *et al.*, 2012) e onde não há exsudato ou outros fluidos é de 3 min (GARCEZ *et al.*, 2008).

Outro fator importante da substância fotossensibilizadora é a sua concentração, que em locais sem exsudato ou fluidos, para o azul de metileno é indicada a concentração de 0,005% e em casos com sangue, saliva, fluido gengival ou qualquer outro veículo diluente ou proteico, a indicação do azul de metileno é na concentração de 0,01% (EDUARDO *et al.*, 2015). Esta substância tem característica hidrofílica, baixo peso molecular e carga positiva que lhe permitem passar através das membranas externas de bactérias gram negativas (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003).

Este fotossensibilizador usado na forma de nanocápsulas em matrizes do copolímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) para tratamento de tumor Glioblastoma em camundongo, mostrou-se um potencial agente neuroterapêutico pela sua capacidade de permear a barreira hemato-encefálica (CASTAÑEDA-GILL *et al.*, 2017). Este estudo demonstrou que o azul de metileno nanoencapsulado conseguiu atingir o alvo e teve bons níveis de inibição celular, sendo tão bom ou melhor que o azul de metileno não encapsulado. De Freitas *et al.* (2016) também utilizaram nanocápsulas de MB na presença de PLGA em associação com PDT, em periodontite crônica, obtendo efeito maior de 28,82% no sangramento gengival quando comparado ao controle sem a PDT.

4.6 NANOTECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

A nanotecnologia é uma ciência inovadora emergente que desperta, cada vez mais, o interesse das áreas médicas e odontológicas para pesquisas e patentes de produtos formulados com esta tecnologia (ALKATANI, 2018; SILVESTRE *et al.*, 2021).

A nanotecnologia atua na prevenção de cáries e da doença periodontal pela acessibilidade das terapias em escala nanométrica à locais mais distantes (ALKATANI, 2018). A PDT associada a fotossensibilizadores incorporados nos nanossistemas para administração em locais inacessíveis pela instrumentação mecânica convencional poderá melhorar a

biodisponibilidade e solubilidade do agente sensibilizador por estar protegido contra fatores externos e físico-químicos, minimizando os efeitos colaterais e melhorando a ação terapêutica pela vantagem de apresentar uma liberação controlada, ser seletivo e atingir somente o tecido alvo (SILVESTRE *et al.*, 2021). Além disso, esta forma de administração deve coibir a resistência bacteriana por permanecer pouco tempo no local devido à forma de ação se dar pela reação da luz com a formação de reações com o oxigênio culminando em morte celular (BAPTISTA *et al.*, 2017).

Um sistema de administração local de medicamentos deve liberar o agente de forma controlada, manter sua concentração por período prolongado, ser biodegradável, ser biocompatível e não irritar os tecidos (JOSHI *et al.*, 2016). Desta forma, a técnica de nanoencapsulação tem sido utilizada como uma boa alternativa para o carreamento de medicações (ALKAHTANI, 2018; CASTAÑEDA-GILL *et al.*, 2017; CHIN *et al.*, 2016; CHIN *et al.*, 2018; DE FREITAS *et al.*, 2016; SHERWANI *et al.*, 2015; MIRZAHOSSEINPOUR *et al.*, 2020; SILVESTRE *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2019).

A implementação da nanotecnologia é importante por aperfeiçoar o sistema de entrega dos corantes e/ou fotossensibilizadores em alvos biológicos (SILVESTRE *et al.*, 2021). A terapia fotodinâmica com fotossensibilizadores incorporados nos nanossistemas para administração em locais inacessíveis pelo tratamento mecânico convencional da doença periodontal poderá melhorar a biodisponibilidade e solubilidade do agente sensibilizador por estar protegido contra fatores externos e físico-químicos, minimizando os efeitos colaterais e melhorando a ação terapêutica pela vantagem de ter liberação controlada, ser seletivo e atingir somente o tecido alvo (SILVESTRE *et al.*, 2021).

Além disso, a reação do agente fotossensibilizador atua pela produção de espécies reativas de oxigênio que não tem ação celular específica interagindo com vários substratos e estruturas celulares o que torna improvável a ocorrência de cepas resistentes (SILVESTRE *et al.*, 2021). Ainda o azul de metileno como agente fotossensibilizador utilizado com carga catiônica aumenta a reação com o oxigênio aumentando sua capacidade bactericida (KEPLAC-CERAJ *et al.*, 2011). Esta substância tem característica hidrofílica, baixo peso molecular e carga positiva que lhe permitem passar através das membranas externas de bactérias gram negativas (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003).

A invasão bacteriana nos túbulos dentinários e no cimento radicular chega a 300 micrômetros sendo desafiador para o tratamento mecânico convencional da doença periodontal (KARAN *et al.*, 2017). As substâncias ácidas modificadoras de superfície da raiz destinam-se a desintoxicar a superfície radicular, remover a camada de lama dentinária e a promover a

desmineralização, aumentando a adesão das redes de fibrina e fibroblastos às superfícies radiculares, levando à exposição da matriz de colágeno (SILVA *et al.*, 2012) o que poderia aumentar a eficácia da PDT, uma vez que as substâncias ácidas poderiam melhorar a cicatrização e a regeneração periodontal após procedimento de raspagem e alisamento radicular, como mostrado pelo estudo *in vitro* de Nanda *et al.* (2014).

Na raspagem e alisamento radicular subgingival as curetas alcançam o tecido conjuntivo e facilitam a entrada do azul de metileno em seu interior (ANDRADE *et al.*, 2014). Ainda o aumento da permeabilidade dos túbulos dentinários, pelo uso do azul de metileno em pH ácido expondo o colágeno, facilitaria a penetração deste sensibilizador nos túbulos dentinários e no cemento radicular melhorando a ação de desinfecção nos mesmos (SILVA *et al.*, 2012).

No intuito de facilitar a penetração do azul de metileno em zonas mais profundas e na tentativa de alcançar locais inacessíveis pelo tratamento periodontal convencional a nanoencapsulação do azul de metileno em matrizes poliméricas pode ser uma alternativa (KLEPAC-CERAJ *et al.*, 2011).

Dentre os sistemas nanoparticulados carreadores de medicamentos podemos citar as nanocápsulas e/ou nanopartículas poliméricas. As nanopartículas poliméricas podem ser obtidas pela técnica de encapsulação. A tecnologia de encapsulação consiste no carregamento de compostos biologicamente ativos, como o azul de metileno em matrizes poliméricas naturais (celulose e seus derivados, zeína, quitosana, entre outros) mantendo sua estabilidade físico-química e biológica além de promover a liberação no local e na taxa desejados (RAJESHWARI *et al.*, 2019).

A utilização de substâncias inócuas ao meio ambiente vem sendo intensamente estudada como matrizes em sistemas de encapsulação. Dentre estas substâncias podemos citar os biopolímeros naturais de amido, celulose, quitosana e gelatina. Estes são usados como matrizes na síntese das nanopartículas por apresentar excelentes propriedades de biocompatibilidade, baixo custo, atóxico, além de serem biodegradáveis (TAY *et al.*, 2012).

A celulose é um polímero natural em abundância, por ser isolada de vários recursos naturais como, algodão, madeira, palha de milho, casca de coco, bagaço de cana, casca de gergelim, fibra de cânhamo e rachis de banana (resíduos fibrosos) (CHIN *et al.*, 2016). As nanopartículas de celulose têm potencial para serem transportadoras de entrega de drogas porque seu diâmetro pode ser ajustado para liberar os perfis cinéticos desejados, de azul de metileno, de forma sustentada e de maneira controlada e em condições fisiológicas, otimizando a eficiência de carregamento (CHIN *et al.*, 2016; CHIN *et al.*, 2018).

Dentre as diversas técnicas de encapsulação, destaca-se a nanoprecipitação. Este método de encapsulação apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos demais sistemas de encapsulação, como rapidez, fácil utilização e simplicidade, além de permitir a produção de nanopartículas (100-300 nm) com distribuição estreita e unimodal (DA ROSA *et al.*, 2020).

A terapia fotodinâmica é bastante estudada, mas há poucos estudos englobando-a com a nanotecnologia e as infecções orais (SILVESTRE *et al.*, 2021). Alguns estudos mais recentes englobam a terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador azul de metileno (DARABPOUR *et al.*, 2017; KEPLAC-CERAJ *et al.*, 2011; PAGONIS *et al.*, 2010; SHERWANI *et al.*, 2015).

Substâncias fotossensíveis como azul de metileno são comumente carregados em matrizes poliméricas devido suas ações antimicrobianas e utilizadas em associação à PDT. Pagonis *et al.* (2010) avaliaram a PDT com nanopartículas de PLGA carregadas com o fotossensibilizador azul de metileno (MB) contra *Enterococcus faecalis* em suspensão e inoculados em canais radiculares de dentes extraídos. Concluíram que estas nanopartículas de PLGA carregadas com o fotossensibilizador azul de metileno podem ser adjuvantes promissores no tratamento endodôntico antibacteriano (PAGONIS *et al.*, 2010).

Nanopartículas de PLGA carregadas com o fotossensibilizador MB foram testadas também em suspensão obtidas de placas bacterianas removidas de pacientes com periodontite crônica (KLEPAC-CERAJ *et al.*, 2011). Estes autores utilizaram o azul de metileno na forma catiônica (carga positiva) e na forma aniônica (carga negativa) com luz vermelha de 665nm em fase planctônica e em biofilme. Eles identificaram que as nanopartículas PLGA carregadas com azul de metileno na forma catiônica tiveram fototoxicidade maior tanto na fase planctônica quanto em biofilme quando comparadas com a nanopartícula PLGA com o azul de metileno na forma aniônica e azul de metileno livre. Concluíram que as nanopartículas PLGA carregadas com azul de metileno na forma catiônica tem potencial para serem utilizadas na PDT (KLEPAC-CERAJ *et al.*, 2011).

Diante do exposto, a utilização de matrizes poliméricas no carregamento de moléculas fotoativas com a PDT pode ser um complemento promissor no tratamento antimicrobiano na periodontia, contra diversos microrganismos. Apesar do resultado satisfatório dos estudos apresentados (CASTAÑEDA-GILL *et al.*, 2017; DARABPOUR *et al.*, 2017; DE FREITAS *et al.*, 2016; KEPLAC-CERAJ *et al.*, 2011; MIRZAHOSSEINPOUR *et al.*, 2020; PAGONIS *et al.*, 2010; SHERWANI *et al.*, 2015) não se identificou até a presente data estudo específico sobre a nanoencapsulação do azul de metileno em matrizes de metilcelulose associado na terapia fotodinâmica com o objetivo de erradicar os microrganismos presentes em bolsas periodontais, o que caracteriza este estudo como pioneiro.

Com a finalidade de aprofundar os estudos sobre a Terapia fotodinâmica associada a fotossensibilizantes no combate aos patógenos periodontais, parte desta revisão está apresentada no Anexo 1, e foi publicada como um capítulo de livro:

A descrição metodológica, resultados da síntese, caracterização da avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno, fotossensibilizadas com laser de baixa potência, sobre os principais microrganismos da doença periodontal serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito intitulado: **“Avaliação físico-química e antimicrobiana de nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas para aplicação na periodontia”**.

5 MANUSCRITO 1: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE AZUL DE METILENO FOTOSSENSIBILIZADAS PARA APLICAÇÃO NA PERIODONTIA

5.1 RESUMO

A periodontite é um problema de saúde pública e predispõe a população ao agravamento de outras comorbidades aumentando o risco de complicações sistêmicas. O tratamento convencional mecânico/químico/cirúrgico da periodontite, nem sempre conseguem eliminar microrganismos mais resistentes. Sistemas nanoparticulados têm sido estudados para viabilizar a entrega de agentes ativos a locais inatingíveis com formulações sistêmicas. Desta forma o objetivo deste estudo foi: (a) sintetizar nanopartículas de azul de metileno em duas concentrações (0,01%, 0,005%) e em três quantidades em massa de metilcelulose (0,01g; 0,001g; 0,005g) pelo método de nanoprecipitação; (b) realizar a caracterização físico-química e morfológica quanto a eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão e liberação controlada; (c) avaliar a ação antimicrobiana das nanopartículas fotossensibilizadas com o uso da terapia fotodinâmica com laser de baixa potência frente aos principais microrganismos envolvidos nas infecções periodontais. As nanopartículas de azul de metileno apresentaram uma eficiência de encapsulação próximo a 100%, e os menores resultados de tamanho de partícula (186 e 274 nm) foram atribuídas as formulações com menores concentrações de azul de metileno e metilcelulose. As amostras apresentaram uma liberação lenta e controlada ao longo das 10 horas avaliadas. As nanopartículas de azul de metileno fotossensibilizadas apresentaram efetiva ação antimicrobiana contra *S.mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A.actinomycescomitans* e *C. albicans*, quando comparado ao azul de metileno puro. Com base nestes resultados entende-se que este é um produto inovador e promissor para ser utilizado como adjuvante ao tratamento periodontal convencional e que pode diminuir a resistência antimicrobiana pela sua atuação local associado a PDT. Desta forma há viabilidade de obtenção de protocolos seguros, adequados, de fácil manuseio e de acessibilidade para todos, a fim de diminuir a resistência microbiana a antibióticos alopáticos e efetivar maiores taxas de sucesso nos tratamentos periodontais

Palavras chaves: Azul de metileno. Antimicrobiano. Nanotecnologia. Terapia fotodinâmica. Doença Periodontal.

5.2 ABSTRACT

Periodontitis is a public health problem and predisposes the population to the worsening of other comorbidities, increasing the risk of systemic complications. Conventional mechanical/chemical/surgical treatment of periodontitis does not always manage to eliminate more resistant microorganisms. Nanoparticulate systems have been studied with the aim of delivering active agents to unreachable locations with systemic formulations. Thus, the objective of this study was: (a) to synthesize methylene blue nanoparticles in two concentrations (0.01%, 0.005%) and in three amounts by mass of methylcellulose (0.01g; 0.001g; 0.005g) by the method of nanoprecipitation; (b) to analyze the physicochemical and morphological

characterization regarding encapsulation efficiency, particle size, polydispersity index, zeta potential, transmission electron microscopy and controlled release; (c) to evaluate the antimicrobial action of photosensitized nanoparticles with the use of photodynamic therapy with low-level laser against the main microorganisms involved in periodontal infections. The methylene blue nanoparticles showed an encapsulation efficiency close to 100%, and the smallest particle size results (186 and 274 nm) were attributed to formulations with lower concentrations of methylene blue and methylcellulose. The samples showed a slow and controlled release over the 10 hours evaluated. The photosensitized methylene blue nanoparticles showed effective antimicrobial action against *S.mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A.actinomycescomitans* and *C. albicans*, when compared to pure methylene blue. These results showed that this is an innovative and promising product to be used as an adjunct to conventional periodontal treatment and that it can reduce antimicrobial resistance due to its local action associated with PDT. Thus, it is possible to obtain safe, adequate, easy-to-handle and accessible protocols in order to reduce microbial resistance to allopathic antibiotics and to achieve higher success rates in periodontal treatments.

Key-words: Methylene blue. Antimicrobial. Nanotechnology. Photodynamic therapy. Periodontal disease.

5.3 INTRODUÇÃO

A periodontite é um problema de saúde pública que aumenta com a idade, tendo maior prevalência em idosos (NAZIR *et al.*, 2020). Com etiologia microbiana diversificada é uma doença que causa desmineralização radicular, amolecimento do cemento e contaminação por lipopolissacarídeos bacterianos, resultando muitas vezes em mobilidade e perda dentária (FERREIRA *et al.*, 2018).

A penetração de microrganismos nas lacunas de cemento, nos túbulos dentinários e a presença da lama dentinária limitam os efeitos da terapia periodontal convencional (FERREIRA *et al.*, 2018). A progressão da infecção periodontal aumenta a diversidade bacteriana tornando o biofilme mais complexo e patogênico, sendo capaz de inibir os mecanismos da resposta de proteção inflamatória e imunológica do hospedeiro, impedindo-o de se proteger, mesmo perante administração de antibióticos e levando a uma resistência antimicrobiana aos antibióticos alopáticos (MOMBELLI, 2018).

Para incrementar as terapias convencionais periodontais, novos recursos estão surgindo, tal como a terapia fotodinâmica (PDT) com substâncias fotossensibilizadoras que têm demonstrado resultados promissores na diminuição de microbianos ao utilizar agentes ativos nanoparticulados com os sistemas de administração local (RAJESHWARI *et al.*, 2019; SILVESTRE *et al.*, 2021; TAN; SAFII; RAZALI, 2020). A associação da PDT com fotossensibilizantes nanoparticulados conseguem penetrar em áreas inatingíveis com sua formulação original (RAJESHWARI *et al.*, 2019; TAN; SAFII; RAZALI, 2020). Desta forma,

o sistema de administração local do agente antimicrobiano deve ser liberado de forma controlada, manter sua concentração por período prolongado, ser biodegradável, biocompatível e não irritar os tecidos (JOSHI *et al.*, 2016).

Dentre os sistemas nanoparticulados, carreadores de agentes antimicrobianos, pode-se citar as nanopartículas poliméricas (CHIN *et al.*, 2018; DE FREITAS *et al.*, 2016). A tecnologia de encapsulação consiste no carregamento de compostos biologicamente ativos, como o azul de metileno em matrizes poliméricas como a metilcelulose mantendo sua estabilidade físico-química, biológica, liberação controlada e ação antimicrobiana potencializada (RAJESHWARI *et al.*, 2019). Uma das técnicas utilizadas para obtenção de encapsulação é o método da nanoprecipitação. Este método apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos demais sistemas de encapsulação, como rapidez, fácil utilização e simplicidade, além de permitir a produção de nanopartículas (100-300 nm) com distribuição estreita e unimodal (DA ROSA *et al.*, 2020).

A celulose é um polímero natural em abundância, por ser isolada de vários recursos naturais (CHIN *et al.*, 2016). A metilcelulose é um éter de celulose proveniente do tratamento alcalino da celulose (hidróxido de sódio 18%), seguida de reação com cloreto de metila, onde os hidrogênios e os grupos hidroxilas da celulose são substituídos, parcialmente, por grupos alquila(metil) formando grupos éter metílicos (celulose-O-CH₃), com isto ocorre aumento da solubilidade (SONG *et al.*, 2010). A metilcelulose é a mais resistente à água e, a menos hidrofílica dos derivados de celulose (BOURTOOM, 2008).

O azul de metileno (MB) fotossensibilizado é um agente antimicrobiano bastante utilizado na PDT em razão de possuir alto grau de seletividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas (BAPTISTA *et al.*, 2017) sendo esta associação efetiva no tratamento de periodontites, lesões endodônticas, herpes simples e candidíase (EDUARDO *et al.*, 2015; DARABPOUR *et al.*, 2017; PAGONIS *et al.*, 2010).

Possivelmente, a PDT tem efeito favorável por atuar em vários locais biomoleculares (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) no alvo patogênico específico, inibindo o desenvolvimento de resistência bacteriana, tornando-a uma terapia eficaz e segura de combate a bactérias, fungos, vírus e protozoários (SILVESTRE *et al.*, 2021).

Fotossensibilizadores incorporados em nanossistemas associados à PDT podem atingir locais inacessíveis à instrumentação mecânica periodontal podendo melhorar a biodisponibilidade e solubilidade do agente sensibilizador, uma vez que a matriz polimérica o protege contra fatores externos e físico-químicos, pode reduzir a resistência bacteriana por

permanecer pouco tempo no local, minimiza os efeitos colaterais e melhora a ação terapêutica (SILVESTRE *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar físico-quimicamente nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana das mesmas quando fotossensibilizadas com laser de baixa potência frente às bactérias periodontopatogênicas *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. actinomycetemcomitans* e ao fungo *C. albicans*.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Material

Os materiais utilizados na síntese das nanopartículas foram azul de metileno, metilcelulose, polaxamer 407 (Pluronic F-127) adquiridos da Sigma-Aldrich. Os meios de cultura utilizados foram: ágar Müeller-Hinton e ágar Trípico de Soja (Himedia), ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) (Merck) e ágar Sabourad (Audaz).

Os microrganismos utilizados foram *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* - ATCC 29522, *S. mutans* ATCC-25175 (adquiridos na Plast Labor-Rio de Janeiro); e *Escherichia coli* LB 25922; *Staphylococcus aureus* LB 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* LB 27853, adquiridos na Laborclin e *C. Albicans* adquiridos na empresa Brasil Científica.

5.4.2 Síntese das nanopartículas de azul de metileno

Nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno foram preparadas pelo método de nanoprecipitação em triplicata (n=3) conforme metodologia descrita por Chin, Jimmy, Pang (2018). Primeiramente foram preparadas 10 mL de soluções aquosas de metilcelulose nas quantidades em massa: 0,01g; 0,001g; 0,005g. Nesta solução foram adicionadas duas concentrações diferentes de azul de metileno: 0,01%, 0,005 % (m/v). Em seguida a esta solução foi adicionado 0,15 g do surfactante Pluronic F127. Posteriormente 1 mL dessas soluções foram dispersas em 20 mL de etanol (95%) com homogeneização em Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati) a 10.000 rpm por 3 minutos. Amostra controle foi sintetizada sem a presença do azul de metileno.

As amostras analisadas foram distribuídas em onze subgrupos conforme descrito a seguir:

Onde: MB significa methylene blue, em português azul de metileno, e Free MB em português azul de metileno livre.

1. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,01-MB 0,01%)
2. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,01-MB 0,005%)
3. Nanopartículas com 0,001g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,001-MB 0,01%)
4. Nanopartículas com 0,001g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,001-MB 0,005%)
5. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,005-MB 0,01%)
6. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,005-MB 0,005%)
7. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose (MC 0,01-Free MB)
8. Nanopartículas com 0,001 g de metilcelulose (MC 0,001-Free MB)
9. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose (MC 0,005-Free MB)
10. 0,005% de azul de metileno (MB 0,005%)
11. 0,01% de azul de metileno (MB 0,01%)

5.4.3 Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas de azul de metileno

A caracterização físico química das nanopartículas de azul de metileno foi estabelecida pelos parâmetros de eficiência de encapsulação (EE), tamanho médio de partícula (Z - ave), potencial zeta (ζ - mV) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e liberação controlada.

5.4.3.1 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação das nanopartículas de metilcelulose foi avaliada em triplicata (n=3) de acordo com metodologia descrita por da Rosa *et al.* (2020). As nanopartículas foram submetidas à técnica de centrifugação em suspensão utilizando filtros Amicon Ultra Centrifugal com membrana Ultracel 30 k (Milipore, Irlanda). O procedimento consistiu em centrifugar as amostras por 30 min a uma velocidade de 6000 rpm, separando os compostos

encapsulados e não encapsulados. O filtrado que permeia a membrana filtrante era constituído pelos compostos não encapsulados e foram analisados. O azul de metileno não encapsulado (sobrenadante) foi quantificado por espectroscopia no UV-vis em comprimento de onda de 655 nm. A concentração molar de azul de metileno foi calculada a partir de uma curva de calibração em solução alcóolica de azul de metileno. A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada de acordo com a equação 1:

Equação 1: $EE\% = (\text{azul de metileno inicial} - \text{azul de metileno livre} / \text{azul metileno inicial}) \times 100$.

5.4.3.2 Determinação do tamanho de partícula (*Z-ave*), índice de polidispersão (*IP*) e potencial zeta (ζ)

A determinação do tamanho da partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das nanopartículas foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments). As amostras de nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno e amostra controle foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25 °C a um ângulo de 173° em triplicata (n=3). Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

5.4.3.3 Análises morfológica por MET

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 70 kV. As soluções contendo as nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno e amostra controle foram previamente diluídas em água ultrapura Milli-Q, e cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre *grids* de cobre revestidas com carbono (200 mesh). Após secagem à temperatura ambiente, as *grids* foram observadas no microscópio.

5.4.3.4 Liberação controlada

A liberação controlada do azul de metileno nanoencapsulado foi conduzida de acordo com metodologia descrita por da Rosa *et al.* (2015). Inicialmente 5 mL de nanopartículas de azul de metileno foram dispersas em 20 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) (pH

~7,4) a $37 \pm 0,5$ ° C. Posteriormente em intervalos de tempo predeterminados (nas primeiras 8 horas foram retiradas alíquotas de hora em hora e posteriormente a cada 12 horas até a curva de liberação atingir um platô), a mistura de nanopartículas de azul de metileno / solução tampão foram centrifugados e os sobrenadantes foram removidos e substituídos com o mesmo volume de solução tampão PBS. As concentrações molares de azul de metileno no sobrenadante foram determinados a partir dos valores de absorbância medidos a 655 nm contra a curva de calibração de azul de metileno em PBS em pH~7.4. A porcentagem de azul de metileno liberada em um intervalo de tempo específico foi quantificada com base na Equação (2).

$$\text{Equação 2: MB liberado (\%)} = ([\text{MB liberado}] / [\text{MB}] \text{ inicial}) \times 100\% \quad (2)$$

Onde: [MB] liberado é a concentração de MB liberada no tempo (t) e [MB] inicial é a concentração de MB sendo carregado na nanopartícula de metilcelulose.

5.4.4 Avaliação antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno

A análise da efetividade antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno (*methylene blue*-MB, em inglês) foi conduzida utilizando a metodologia de contagem padrão em placas de acordo com metodologia descrita por Knorst *et al.* (2019).

As amostras analisadas foram distribuídas em onze subgrupos conforme descrito a seguir:

Onde: MB significa *methylene blue*, em português azul de metileno, e Free MB em português azul de metileno livre.

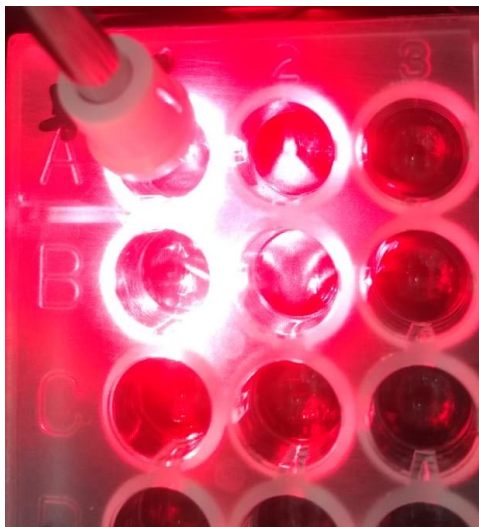
1. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,01-MB 0,01%)
2. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,01-MB 0,005%)
3. Nanopartículas com 0,001g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,001-MB 0,01%)
4. Nanopartículas com 0,001g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,001-MB 0,005%)
5. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose com 0,01% de azul de metileno (MC-0,005-MB 0,01%)
6. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose com 0,005% de azul de metileno (MC-0,005-MB 0,005%)
7. Nanopartículas com 0,01 g de metilcelulose (MC 0,01-Free MB)

8. Nanopartículas com 0,001 g de metilcelulose (MC 0,001-Free MB)
9. Nanopartículas com 0,005 g de metilcelulose (MC 0,005-Free MB)
10. 0,005% de azul de metileno (MB 0,005%)
11. 0,01% de azul de metileno (MB 0,01%)

A atividade antimicrobiana dos grupos acima foi testada nos seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans*, *S.aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Para os cultivos das células bacterianas foi elaborada uma suspensão padronizada de 10^8 células. mL^{-1} de microrganismos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em placa a 37°C . O microrganismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi incubado em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*), em jarra de anaerobiose a 37°C por 72 h. Todos os microrganismos foram padronizados em solução salina pelos parâmetros de turvação com auxílio da escala Mcfairland.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, em uma placa de 96 poços foram adicionados a suspensão microbiana e a amostras na proporção (1:3). Em um primeiro momento os microrganismos ficaram em contato com as nanopartículas de azul de metileno e amostras controle durante 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Após este período as amostras foram irradiadas (fotossensibilizadas) utilizando como fonte de luz um laser de diodo de baixa potência (DMC -Therapy) com comprimento de onda de 660 nm, modo de emissão contínua, potência útil do emissor em 100mW com energia de 9 joules por 90 segundos (KNORST *et al.*, 2019). A ponteira do laser foi localizada a uma distância de 10mm do topo dos poços. Em seguida foi realizada a irradiação, intercalando as amostras entre 4 poços para dar o devido distanciamento da fonte de luz para que não houvesse sobreposição de irradiação entre amostras conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Imagem ilustrativa da fotossensibilização das amostras com laser de baixa potência



Fonte: Os autores.

A seguir a suspensão tratada (microrganismos + amostras) foram colocadas em solução tampão (10^{-1}), e realizadas diluições decimais e posteriormente semeadas em ágar Müller Hinton e incubadas a 37 °C por 48 horas. Para *C. Albicans* foi realizada a incubação em ágar *Sabourad* a 37 °C por 48 horas. Para *Aggregatybacter actinomycetemcomitans* as amostras foram incubadas em uma camada dupla de caldo TSB e Müller Hinton, em jarra de anaerobiose a 37°C por 72 h. Os resultados foram expressos por unidade formadora de colônia (UFC) por mL (UFC.mL^{-1}).

5.4.5 Análise dos dados

Os dados obtidos foram expressos como médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 7.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Eficiência de encapsulação

No presente estudo foram encontrados resultados satisfatórios de eficiência de encapsulação (próximos a 100%), demonstrados na Tabela 1. Esses resultados revelam um eficiente aprisionamento do azul de metileno na matriz polimérica de metilcelulose.

A eficiência de encapsulação pelo método de nanoprecipitação, depende de alguns fatores determinantes como: tipo de revestimento utilizado, da interação deste com o composto ativo, natureza química do composto ativo e sua polaridade (NUNES *et al.*, 2022).

A literatura aponta, que a eficiência de encapsulação em matrizes hidrofílicas, como a metilcelulose, pode atingir valores máximos de 100 % (da Rosa *et al.* 2020), e em casos de compostos lipofílicos, como a celulose, esses resultados podem variar entre 60 a 90% (CHIN; JIMMY; PANG, 2018).

Neste estudo, os resultados de eficiência de encapsulação foram próximos a 100 %, e pode ser atribuído a melhor solubilidade da metilcelulose em suspensões coloidais aquosas quando comparado a outros polímeros apolares como celulose (RIA *et al.*, 2020).

Corroborando, com a literatura, sobre a polaridade do material de parede e eficiência de encapsulação, Chin; Jimmy; Pang (2018) ao utilizar como material de parede compostos apolares, como celulose para encapsular o azul de metileno, obtiveram resultados de eficiência de encapsulação, inferiores ao presente estudo (variando entre 56 a 89%).

Tabela 1 – Eficiência de encapsulação, Tamanho de partícula, Índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de azul de metileno carregadas com metilcelulose .

	Amostra	Eficiência de encapsulação (%)	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1	MC 0,01-MB 0,01	99,2 ± 0,0c	357,9 ± 4,2cd	0,633 ± 0,11bc	2,2 ± 0,4bc
2	MC 0,01-MB 0,005	99,6 ± 0,1 ^a	306,8 ± 1,4e	0,519 ± 0,001ab	4,4 ± 0,4ab
3	MC 0,001-MB 0,01	99,2 ± 0,0c	375,5 ± 7,4c	0,588 ± 0,14a	4,6 ± 1,1ab
4	MC 0,001-MB 0,005	99,1 ± 0,1c	186,15 ± 3,1g	0,274 ± 0,11c	1,7 ± 0,04c
5	MC 0,005-MB 0,01	99,4 ± 0,0b	402,8 ± 11,6b	0,364 ± 0,005c	0,6 ± 0,2c
6	MC 0,005-MB 0,005	98,8 ± 0,1d	274,06 ± 10,8f	0,353 ± 0,003bc	2,9 ± 0,3bc
7	MC 0,01-Free MB	--	495,1 ± 7,0a	0,730 ± 0,007bc	1,4 ± 0,4c
8	MC 0,001-Free MB	--	340,9 ± 4,1d	0,625 ± 0,2bc	2,8 ± 0,1bc
9	MC 0,005-Free MB	--	314 ± 4,0e	0,665 ± 0,1c	6,6 ± 1,4a

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) quando analisado pelo teste de Tukey na coluna

5.5.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho de partícula depende de fatores como: natureza e concentração do polímero e do surfactante na fase orgânica, polaridade dos solventes, natureza e proporção de fases interno-externas (NUNES *et al.*, 2022).

Os resultados do presente estudo corroboram com o proposto por (NUNES *et al.*, 2022), pois as partículas com menores diâmetros, apresentaram em sua composição menores quantidade em massa de metilcelulose (0,001 e 0,005g), bem como menores concentrações de azul de metileno (0,005%) (CHIN; JYMMI; PANG, 2018).

As nanopartículas MC 0,001-MB 0,005 (amostra 4) e MC 0,005-MB 0,005 (amostra 6), apresentaram os menores resultados de tamanho, variando entre 186,15 e 274,06 nm, respectivamente (Tabela 1). Estudo de Chin; Jimmy; Pang (2018) corrobora com estes achados, utilizando nanopartículas de celulose com azul de metileno onde obtiveram os menores diâmetro de partícula (70nm), nas menores concentrações de celulose.

A proporção de fases interno-externa ou a proporção de solvente/cossolvente é um fator importante a ser considerado quando se analisa o tamanho da partícula (NUNES *et al.*, 2022). Com a proporção de solvente / co-solvente (1:20) utilizado nesse estudo, foi possível obter nanopartículas com diâmetros aceitáveis com tamanho médio de 200 nm nas amostras 4 e 6, conferindo uma boa estabilidade ao sistema.

Chin, Jimmy e Pang (2018) ao utilizar a mesma concentração nas fases interna ou externa (1:20) ao encapsular azul de metileno em matrizes de celulose, obteve tamanho de partículas em torno de 400 nm. Isso revela que pequenas alterações nas variáveis do sistema, podem alterar de forma considerável físico-quimicamente os resultados.

As nanopartículas (MC 0,001-MB 0,005-amostra 4 e MC 0,005-MB 0,005- amostra 6) com menor tamanho de partícula, apresentaram uma distribuição de tamanho homogêneo e unimodal, comprovado pelo índice de polidispersão de 0,274 e 0,353, respectivamente (Tabela 1). Resultados semelhantes foram reportados por Castañeda-Gill *et al.* (2017), ao encapsular o azul de metileno em matrizes de PLGA. A literatura aponta que valores de índice de polidispersão em torno de 0,3, garantem estabilidade a dispersão coloidal, sem a formação de aglomerados ou precipitados (DA ROSA *et al.*, 2020).

Os valores de potencial zeta do presente estudo variou entre 0,6 a 4,6 mV para as amostras carregadas com azul de metileno e 1,4 a 6,6 para as amostras vazias. O potencial zeta indica a estabilidade da suspensão coloidal, de acordo com as forças de repulsividade entre as nanopartículas e as mudanças de potencial na superfície das mesmas, durante o seu

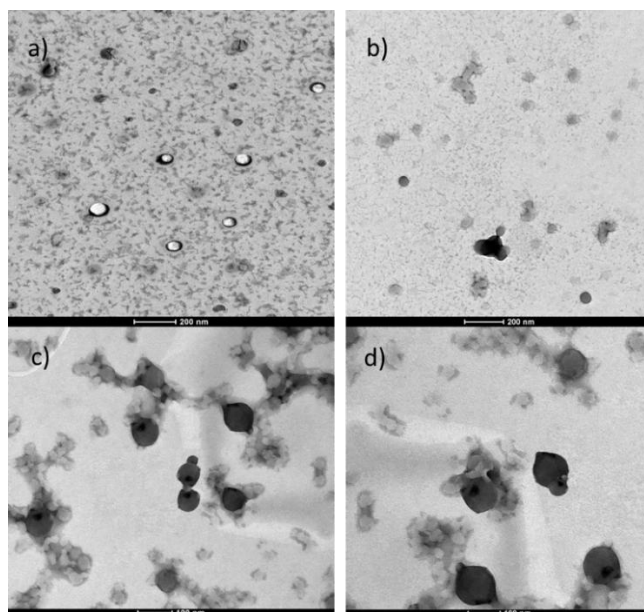
armazenamento (DA ROSA, *et al.* 2020). As dispersões coloidais estabilizadas com surfactantes catiônicos apresentam resultados de potencial zeta superiores a ± 30 m/V, indicando a repulsão entre as partículas impedindo sua agregação (DE MELO *et al.*, 2020).

No entanto quando se utiliza surfactantes aniônicos como o Polaxamer, a estabilidade da dispersão é conferida por impedindo estérico impedindo a coalescência das partículas e permitindo estabilidade físico química no armazenamento (DUMORTIER *et al.*, 2006).

5.5.3 Avaliação morfológica por met

As nanopartículas de azul de metileno com os melhores tamanho de partícula foram: Amostra 4-MC 0,001-MB 0,005 e Amostra 6-MC 0,005-MB 0,005, e as respectivas amostras controle, e foram avaliadas sua morfologia por MET, e estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 – Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão. a) Amostra 8- MC 0,001-Free MB; b) Amostra 9- MC 0,005-Free MB; c) Amostra 4-MC 0,001-MB 0,005 e d) Amostra 6-MC 0,005-MB 0,005



Fonte: os autores.

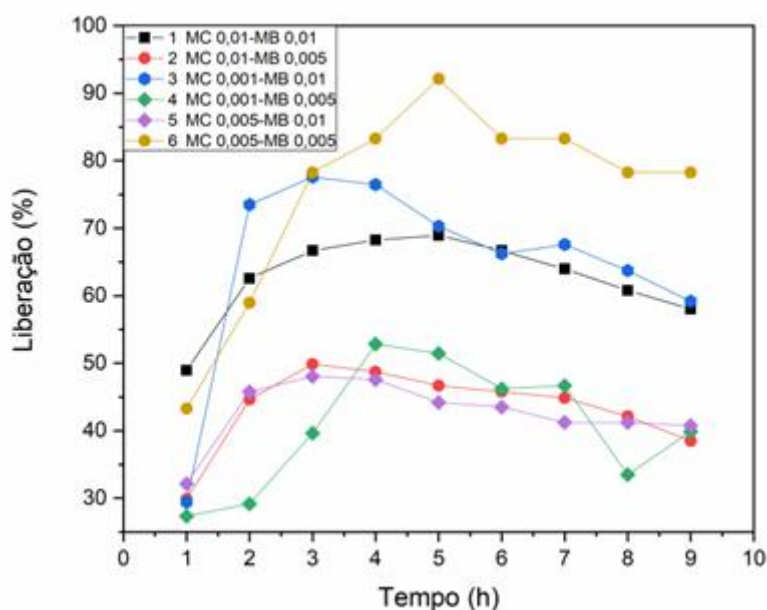
As micrografias das nanopartículas carregadas com azul de metileno e nanopartículas vazias apresentaram ausência de material livre na superfície, com superfície lisa, compacta, com formato esférico e ausência de poros. As paredes externas não apresentaram fissuras ou rachaduras sendo muito importante para garantir uma maior proteção e retenção do agente encapsulado.

As nanopartículas apresentaram diâmetro médio em torno de 100 nm. Menores resultados de tamanho de partícula nas amostras obtidas por MET, pode ser explicado pelo processo de preparação da amostra para a realização das análises, como a remoção do solvente, podendo causar modificações que podem influenciar no formato e tamanho das nanopartículas (DE CARVALHO *et al.*, 2013). Esta diferença de tamanho pode ser também atribuída ao achatamento das partículas no *grid* e ao menor número de partículas visualizadas por MET quando comparadas as técnicas de Espalhamento de Luz (DA ROSA *et al.*, 2015).

5.5.4 Liberação controlada

O perfil de liberação das nanopartículas carregadas com o azul de metileno na presença da solução tampão, está representado na Figura 3.

Figura 3 – Liberação controlada do azul de metileno em matrizes de metilcelulose



Fonte: os autores.

O azul de metileno apresentou uma liberação controlada nas primeiras 10 horas de liberação: em torno de 45 % nas amostras (2) MC 0,01-MB 0,005 e (5) MC 0,005-MB 0,01; cerca de 55% na amostra (4) MC 0,001-MB 0,005; 70 % na amostra (1) MC 0,01-MB 0,01 e (3) MC 0,001-MB 0,01 e cerca de 95% na amostra (6) MC 0,005-MB 0,005; sem a presença de efeitos *burst*, mostrando uma forte interação do azul de metileno com o material de parede.

As amostras 2 e 5 apresentaram os melhores resultados de liberação, com comportamento linear, constante e controlada, liberando entre de 35 a 50% do azul de metileno de forma gradativa ao longo das 10 horas. Esse comportamento cinético de liberação possui tendência a ser mantido até a completa liberação do composto da matriz polimérica (DA ROSA *et al.*, 2015).

Diversos fatores podem influenciar a taxa de liberação de princípios ativos incorporados em matrizes poliméricas de sistemas nanoencapsulados, como as características da matriz polimérica, tamanho e localização das nanopartículas, bem como as propriedades físico-químicas do sistema e a concentração do composto ativo no interior das partículas (CHIN; JYMMI; PANG, 2018; DA ROSA *et al.*, 2020).

O azul de metileno é um fármaco hidrofílico e quando utilizado em nanossistemas com polímeros derivados da celulose, apresentam perfis de liberação diferentes de acordo com o tamanho das partículas obtidas (CHIN; JYMMI; PANG, 2018).

Neste estudo a velocidade de liberação foi diretamente proporcional ao tamanho da partícula. A amostra 6: MC 0,005-MB 0,005, com diâmetro de 274 nm liberou cerca de 95% nas primeiras 10 horas de avaliação. E a amostra 5: MC 0,005-MB 0,01, com tamanho de 402 nm, liberou cerca de 45% ao longo das 10 horas. Esse comportamento é atribuído a maior superfície de contato das partículas menores (CHIN; JYMMI; PANG, 2018).

Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno podem ser utilizadas como sistemas de liberação controlada, sendo uma opção para auxiliar em tratamentos de doenças infecciosas como coadjuvantes às terapias convencionais em aplicação local, pois é possível a obtenção de perfil de liberação controlada, gradativa e linear do composto contido na nanopartícula.

5.5.5 Avaliação antimicrobiana

As nanopartículas de metilcelulose carregadas com azul de metileno em associação com a terapia fotodinâmica demonstraram efetiva ação antimicrobiana contra os microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. actinomycetemcomitans* e *C. albicans*, quando comparado as amostras de azul de metileno puro, comumente utilizado na prática clínica de odontologia. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana das nanopartículas de azul de metileno

Amostra	<i>S. mutans</i>	<i>A. Actynomices</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. Albicans</i>
	UFC/mL					
1 MC 0,01-MB 0,01	2,5x10 ⁴ ±6,4x10 ³ b	5x10 ² ±7,1x10 ² c	<10 ²	1,5x10 ³ ±7,1x10 ² d	<10 ²	<10 ²
2 MC 0,01-MB 0,005	10 ³ ±0,0c	5x10 ² ±7,1x10 ² c	<10 ²	5 x10 ² ±7,1x10 ² d	<10 ²	<10 ²
3 MC 0,001-MB 0,01	10 ³ ±0,0c	5x10 ² ±7,1x10 ² c	4x10 ³ ±1,4x10 ³ b	1,5x10 ³ ±7,1x10 ² d	5x10 ⁵ ±7,1x10 ⁵ b	<10 ²
4 MC 0,001-MB 0,005	3,5x10 ³ ±7,1x10 ² c	5x10 ² ±7,1x10 ² c	10 ³ ± 0,0b	<10 ²	<10 ²	<10 ²
5 MC 0,005-MB 0,01	<10 ²	5x10 ² ±7,1x10 ² c	3x10 ³ ±1,4x10 ³ b	<10 ²	10 ⁶ ±1,4x10 ⁶ b	<10 ²
6 MC 0,005-MB 0,005	<10 ²	5x10 ² ±7,1x10 ² c	1,5x10 ³ ±7,1x10 ² b	5 x10 ² ±7,1x10 ² d	<10 ²	<10 ²
7 MC 0,01-Free MB	1,5x10 ³ ±7,1x10 ² c	5x10 ² ±7,1x10 ² c	5x10 ² ±7,1x10 ² b	7x10 ³ +03±2,8x10 ³ c	<10 ²	<10 ²
8 MC 0,001-Free MB	1,5x10 ³ ±7,1x10 ² c	5x10 ² ±7,1x10 ² c	5x10 ² ±7,1 x10 ² b	10 ³ ±0,0d	<10 ²	<10 ²
9 MC 0,005-Free MB	<10 ²	2,5x10 ⁴ ±3,5x10 ³ a	1,5x10 ³ ±7,1 x10 ² b	1,5x10 ³ ±7,1x10 ²	5x10 ⁵ ±7,1x10 ⁵ b	<10 ²
10 MB 0,01	1,1x10 ⁴ ±7,1x10 ² bc	8,5x10 ³ ±2,1x10 ³ b	9,8x10 ⁴ ±3,5x10 ³ b	6,8x10 ⁴ ±3,5 x10 ³ b	1,8x10 ⁸ ±2,4x10 ⁸ a	2,5x10 ³ ±7,1x10 ² a
11 MB 0,005	2,1x10 ⁵ ±1,4x10 ⁴ a	2,3x10 ⁴ ±3,5x10 ³ a	6,8x10 ⁵ ±2,5x10 ⁵ a	1,3x10 ⁵ ±2,1 x10 ³ a	2,2x10 ⁸ ±3x10 ⁸ a	2,5x10 ³ ±7,1x10 ² a

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) quando analisado pelo teste de Tukey na coluna

Esses resultados satisfatórios de ação antimicrobiana são explicados pela presença do azul de metileno fotossensibilizado. O azul de metileno é uma das principais substâncias antimicrobianas, que possui um alto grau de seletividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas, e na maioria das vezes é utilizado durante a terapia fotodinâmica (SANTIN *et al.*, 2014) como fotossensibilizador exógeno antropogênico que origina produtos de oxigenação e de foto oxidação, capazes de causar morte celular (BAPTISTA *et al.*, 2017).

A ação antimicrobiana do azul de metileno é conseguida quando a molécula interage com a luz do laser e o oxigênio gerando reações químicas que liberam radicais livres ou oxigênio singleto, que culminam na morte celular dos microrganismos (BAPTISTA *et al.*, 2017; EDUARDO *et al.*, 2015).

A ação antimicrobiana do azul de metileno fotossensibilizado é potencializado quando está em escala nanométrica. Os mecanismos com efeitos inibitórios dos sistemas nanoparticulados contra os microrganismos têm sido associados com alterações na permeabilidade da membrana celular, causando perda de constituintes intracelulares, necessários para manter a viabilidade e sobrevivência celular (NARCISO *et al.*, 2021).

Neste estudo, as amostras controle (nanopartículas vazias) também apresentaram ação antimicrobiana, devido o diâmetro nanométrico destas, ocasionando o rompimento da parede celular do microrganismo, e impedindo o crescimento microbiano. Foi observado também, em

algumas amostras de nanopartículas ação bacteriostática, impedindo o crescimento dos microrganismos.

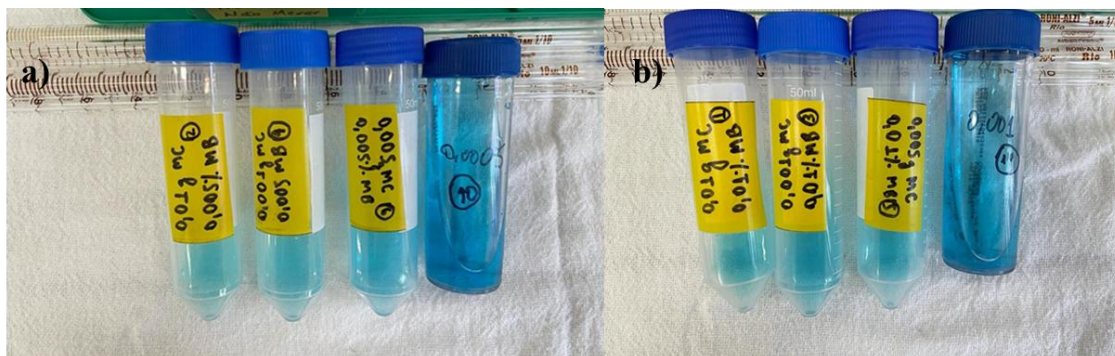
A melhor ação antimicrobiana frente à microrganismos da cavidade oral das nanopartículas de azul de metileno quando comparado ao azul de metileno puro, também foi confirmado em diversos estudos ao avaliar a encapsulação do azul de metileno em matrizes de PLGA (DE FREITAS *et al.*, 2016; PAGONIS *et al.*, 2010, DARABPOUR *et al.*, 2017, KEPLAC-CEJAD *et al.*, 2011).

De Freitas *et al.* (2016) avaliou a efetividade contra bactérias da placa periodontal e planctônicas; Pagonis *et al.* (2010) confirmou a efetividade contra suspensões de espécies de *Enterococcus faecalis* e em canais radiculares de dentes extraídos inoculados com esta bactéria; Darabpour *et al.* (2017) avaliou a ação antimicrobiana contra biofilmes maturados e imaturos de *S.aureus*; Keplac-Cejad *et al.* (2011), investigaram o efeito da PDT nas bactérias da placa dental humana de pacientes com periodontite *in vitro* usando nanopartículas PLGA.

O fotossensibilizador azul de metileno com PDT também se mostra mais efetivo sobre *C. albicans*, na forma nanoencapsulada. Sherwani *et al.* (2015) em estudo experimental induzindo lesões de *Cândida albicans* em ratos estudaram o efeito da PDT com nanopartículas de ouro carregadas com azul de metileno e com azul de toluidina, obtiveram resultados efetivos sobre culturas planctônicas e sobre biofilmes, concluindo que estas podem ser utilizadas no tratamento em lesões cutâneas por *Cândida albicans* e em biofilmes sobre cateteres e implantes médicos.

Na prática clínica de Odontologia são recomendadas a utilização de concentrações de 0,01% e de 0,005% de azul de metileno (EDUARDO *et al.*, 2015). Os melhores resultados das propriedades acima descritas foram encontrados em concentrações de azul de metileno abaixo das concentrações recomendadas na prática clínica da periodontia. Além disso, para aplicações odontológicas é positivo a utilização de concentrações reduzidas de azul de metileno, para evitar problemas de coloração dos dentes (COSTA *et al.*, 2016). Visualmente é possível verificar a diferença de coloração entre as nanopartículas e as soluções de azul de metileno puro nas concentrações de 0,01% e 0,005% (Figura 4). Vale ressaltar que mais estudos experimentais colorimétricos das amostras devem ser conduzidos para reforçar essa afirmação.

Figura 4 – Nanopartículas de azul de metileno e respectiva solução de azul de metileno a) 0,005% e b) 0,01%



Fonte: Os autores.

Os estudos consultados demonstram que a PDT associada com nanopartículas de azul de metileno são efetivos na redução de microrganismos periodontais (DE FREITAS *et al.*, 2016; PAGONIS *et al.*, 2010, DARABPOUR *et al.*, 2017, KEPLAC-CEJAD *et al.*, 2011). Entretanto, os estudos apresentam divergências entre a concentração, tempo de pré-irradiação, fontes de aplicação de luz (led ou laser) e dosimetria, modo de emissão, duração, local de aplicação e comprimento de onda das irradiações (DE FREITAS *et al.*, 2016; PAGONIS *et al.*, 2010, DARABPOUR *et al.*, 2017, KEPLAC-CEJAD *et al.*, 2011). Além disso, a maioria dos estudos realizados são, *in vitro*, com literatura escassa em estudos clínicos *in vivo* (DE FREITAS *et al.*, 2016; PAGONIS *et al.*, 2010, DARABPOUR *et al.*, 2017, KEPLAC-CEJAD *et al.*, 2011).

Os resultados iniciais das nanopartículas de azul de metileno desenvolvido na presente dissertação, associado à PDT são favoráveis e sugerem um futuro promissor. A partir destes resultados novos estudos testando este corante devem ser realizados para avaliar seu comportamento em diferentes concentrações, tempo de pré-irradiação, fontes de aplicação de luz e dosimetria, duração, local de aplicação e comprimento de onda das irradiações entre outros fatores que podem interferir na sua efetividade.

5.6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de azul de metileno em matrizes de metilcelulose possuem potencial para serem carreadoras de azul de metileno. Algumas características físico-químicas das nanopartículas, como o diâmetro pode ser ajustado variando as condições de síntese, para liberar os perfis cinéticos desejados de azul de metileno.

As amostras com os menores tamanho de partícula apresentaram liberação lenta e controlada ao longo das 10 horas avaliadas. Além disso, as nanopartículas fotossensibilizadas foram efetivas na ação antimicrobiana contra *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. actinomycetemcomitans* e *C. albicans*, quando comparado ao azul de metileno puro.

Com base nestes resultados entende-se que este é um produto inovador e promissor com potencial para ser utilizado como adjuvante ao tratamento periodontal convencional devido a efetividade no combate aos microrganismos periodontais.

5.7 REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, M. S.; *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p. 912-919, 2017.
- BOURTOOM, T. Review article edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 237 – 248, 2008.
- CHIN, S. F.; JIMMY, F. B.; PANG, S.C. Size controlled fabrication of cellulose nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 262-266, 2018.
- COSTA, L. M.; *et al.* Tooth color change caused by photosensitizers after photodynamic therapy: An in vitro study. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 160, p. 225–228, 2016.
- DA ROSA; *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)**, v. 481, p. 337-344, 2015.
- DA ROSA, C. G.; *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.
- DE CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANI, C. L.; LINO, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINI, I. C.; OGLIARI, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278– 285, 2013.
- DE FREITAS, L. M.; *et al.* Polymeric nanoparticle-based photodynamic therapy for chronic periodontitis in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 769, 2016.
- EDUARDO, C. P.; *et al.* A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 69, n. 3, p. 226-235, 2015.

FERREIRA, R.; *et al.* Comparison of the effect of root surface modification with citric acid, EDTA, and aPDT on adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts and osteoblasts: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 3, p. 533-538, 2018.

GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 2709-2728, 2006.

JOSHI, D.; *et al.* Advanced drug delivery approaches against periodontitis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 363-377, 2016.

KLEPAC-CERAJ, V.; *et al.* Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 600-606, 2011.

KNORST, J. K.; *et al.* Antimicrobial effect of methylene blue formulations with oxygen carrier at different pHs: preliminary study. **Brazilian Dental Science**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2019.

MOMBELLI, A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 85-96, 2018.

NARCISO, A. M.; *et al.* Antimicrobial green silver nanoparticles in bone grafts functionalization for biomedical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102074, 2021.

NAZIR, M. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. **The Scientific World Journal**, 2020.

NUNES, M. R.; da ROSA, C. G.; BORBA, J. R.; SANTOS, G. M.; FERREIRA, ANA LETÍCIA ANDRADE; BARRETO, PEDRO LUIZ MANIQUE. **Zein nanoparticles: bioactive compounds and controlled delivery**. In: Sougata Jana; Subrata Jana. (Org.). Nanoengineering of Biomaterials Drug Delivery & Biomedical Applications. 1ed.: John Wiley & Sons, 2022, p. 411-436.

PAGONIS T. C.; *et al.* Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 322-328, 2010.

RAJESHWARI, H. R.; *et al.* Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. **Journal of Controlled Release**, v. 307, p. 393-409, 2019.

RIA, S. A.; FERDOUS, T.; ARAFAT, K. Y. A.; M. JAHAN, S. Pulp refining in improving degree of substitution of methylcellulose preparation from jute Pulp. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 2431-2439, 2022.

SANTIN, G. C.; *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SHERWANI, M. A.; *et al.* Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of *C. albicans* infection in BALB/c mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131684, 2015.

SILVESTRE, A. L. P.; *et al.* Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, 2021.

SONG, Y.; GAO, L.; LI, L.; ZHENG, Q. Influence of gliadins on rheology of methylcellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 98 – 104, 2010.

TAN, O. L.; SAFFI, S. H.; RAZALI, M. Commercial local pharmacotherapeutics and adjunctive agents for nonsurgical treatment of periodontitis: a contemporary review of clinical efficacies and challenges. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho as nanopartículas de azul de metileno apresentaram uma eficiência de encapsulação próximo a 100%, e os menores resultados de tamanho de partícula (186 e 274 nm) foram atribuídas as formulações com menores concentrações de azul de metileno e metilcelulose. As amostras apresentaram uma liberação lenta e controlada ao longo das 10 horas avaliadas. As nanopartículas de azul de metileno fotosensibilizadas apresentaram efetiva ação antimicrobiana contra *S.mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A.actinomycetemcomitans* e *C. albicans*, quando comparado ao azul de metileno puro.

Com base nestes resultados entende-se que este é um produto inovador e promissor para ser utilizado com a PDT como adjuvante ao tratamento periodontal convencional e que pode diminuir a resistência antimicrobiana pela sua atuação local. É um produto com ótimas perspectivas futuras na obtenção de protocolos seguros, adequados, de fácil manuseio e de acessibilidade para todos, a fim de diminuir a resistência microbiana a antibióticos alopáticos e efetivar maiores taxas de sucesso nos tratamentos periodontais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, M.; MARTIN, M. V. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. **Oral Diseases**, v. 9, p. 38-44, 2003.

AIAHMARI, F.; SHAIKH, L.; AIDHUBAIBAN. Therapy in the treatment of periodontal diseases: a review. **Journal of International Oral Health**, v. 19, p. 102-108, 2020.

ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2018.

ANDERSEN, R.; *et al.* Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **Journal of Clinical Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 34, 2007.

ANDRADE, P. V. C.; *et al.* Laser de baixa potência na periodontia: uma revisão do estado atual do conhecimento. **Periodontia**, p. 41-49, 2014.

ARIZZI, M.; BERWIG, L.; ROSA, C. G.; MASIERO, A. V. O Efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associada a nanofotossensibilizantes no combate aos patógenos periodontais: uma revisão sistemática. In: Cristina Berger Fadel. (Org.). **Odontologia: Pesquisa e Práticas contemporâneas**. 1. ed. v. 2, p. 155-165. Editora Científica Digital, 2021.

AZIZI, A.; *et al.* Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 203-209, 2019.

BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde**. 1. ed. São Paulo, 2008.

BAGNATO, V. S. **As novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. Editora Livraria da Física, p. 203-209, 2019.

BAHEKAR, A. A.; *et al.* The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. **American Heart Journal**, v. 154, n. 5, p. 830-837, 2007.

BALATA, M. L.; *et al.* Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico. **Periodontia**, v. 20, n. 2, p. 22-32, 2010.

BAPTISTA, M. S.; *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p. 912-919, 2017.

BARTLETT JG.; GILBERT DN. The future of antibiotics and resistance. **New England Journal Medicine**, v. 368, p. 299-302, 2013.

BARTOLD, P. M.; *et al.* Effect of Porphyromonas gingivalis-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 405-411, 2010.

BIASI, P. R.; *et al.* Laser de baixa intensidade como terapia auxiliar no tratamento periodontal Relatos de casos. **Brazilian Journal of Periodontology**, v. 29, n. 3, 2019.

- BOURTOOM, T. Review article edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 237 – 248, 2008.
- BUI, F.Q. *et al.*, Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomedical Journal**, v. 42, p. 27-35, 2019.
- CAMPBELL, L. A.; ROSENFELD, M. E. Infecção e desenvolvimento da aterosclerose. **Arquivos de Pesquisa Médica**, v. 46, n. 5, p. 339-350, 2015.
- CASTAÑEDA-GILL, J. M.; RANJAN, A. P.; VISHWANATHA, J. K. Development and characterization of methylene blue oleate salt-loaded polymeric nanoparticles and their potential application as a treatment for glioblastoma. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 8, n. 4, 2017.
- CHIN, S. F.; JIMMY, F. B.; PANG, S.C. Fabrication of cellulose aerogel from sugarcane bagasse as drug delivery carriers. **Journal of Physical Science**, v. 27, n. 3, 2016.
- CHIN, S. F.; JIMMY, F. B.; PANG, S.C. Size controlled fabrication of cellulose nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 262-266, 2018.
- COSTA, L. M.; *et al.* Tooth color change caused by photosensitizers after photodynamic therapy: An in vitro study. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 160, p. 225–228, 2016.
- DA ROSA, C. G.; *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)**, v. 481, p. 337-344, 2015.
- DA ROSA, C. G.; *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.
- DARABPOUR, E.; *et al.* Fast and effective photodynamic inactivation of 4-day-old biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using methylene blue-conjugated gold nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 37, p. 134-140, 2017.
- DE FREITAS, L. M.; *et al.* Polymeric nanoparticle-based photodynamic therapy for chronic periodontitis in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 769, 2016.
- DESHMUKH, J.; *et al.* Periodontal disease and diabetes—a two way street dual highway. **People's Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 65-71, 2011.
- DIOGUARDI, M.; *et al.* The role of periodontitis and periodontal bacteria in the onset and progression of Alzheimer's disease: a systematic review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 495, 2020.

DOUNGUDOMDACHA, S.; *et al.* Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans at adult periodontitis sites. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 5, p. 437-445, 2001.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 2709-2728, 2006.

EDUARDO, C. P.; *et al.* A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas**, v. 69, n. 3, p. 226-235, 2015.

ELZADEK, F. M.; FARAHAT, M. F. Impact of photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment on clinical and biochemical parameters among patients having mild rheumatoid arthritis with periodontitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, 2022.

FEKRAZAD, R.; *et al.* In vitro photodynamic inactivation of Candida albicans by phenothiazine dye (new methylene blue) and Indocyanine green (EmunDo®). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 52-57, 2015.

FEKRAZAD, R.; ZARE, H.; VAND, S. M. S. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on Staphylococcus aureus and Escherichia coli: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 213-217, 2016.

FERREIRA, A. V.; *et al.* Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico na periodontia clínica atual: Uma breve revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 1, p. 134 – 138, 2017.

FERREIRA, R.; *et al.* Comparison of the effect of root surface modification with citric acid, EDTA, and aPDT on adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts and osteoblasts: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 3, p. 533-538, 2018.

GARCEZ, A. S.; *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 2, p. 138-142, 2008.

GARCIA, F. B.; DIAS, A. T.; TINOCO, E. M. B.; FISCHER, R. G. Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica como adjunto ao tratamento periodontal de pacientes com periodontite agressiva. **Revista de Periodontia**, v. 21, n. 1, p. 12-19, 2011.

GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, 2018.

GOMES, S. C.; *et al.* Dental biofilm of symptomatic Covid-19 patients harbours SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 48, p. 880-885, 2021.

- GOMES-FILHO, I. S.; *et al.* Influence of periodontitis in the development of nosocomial pneumonia: a case control study. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 5, p. e82-e90, 2014.
- GOODSON, J. M. Gingival crevice fluid flow. **Periodontology**, v.31, p.43-54, 2003.
- HARRIS, F., CHATFIELD L.K., PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitisers-photodynamic agents with multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Target**, v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.
- ISHIKAWA, I.; *et al.* Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? **Periodontology 2000**, v. 50, n. 1, p. 90-126, 2009.
- JOSHI, D.; *et al.* Advanced drug delivery approaches against periodontitis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 363-377, 2016.
- KARAN, P. S. B. H.; *et al.* Stimulation of human gingival fibroblasts viability and growth by roots treated with high intensity lasers, photodynamic therapy and citric acid. **Archives of Oral Biology**, v. 81, p. 1-6, 2017.
- KLEPAC-CERAJ, V.; *et al.* Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 600-606, 2011.
- KNORST, J. K.; *et al.* Antimicrobial effect of methylene blue formulations with oxygen carrier at different pHs: preliminary study. **Brazilian Dental Science**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2019.
- LIN, D.; *et al.* Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 5, p. 833-841, 2007.
- LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral** .5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S/A, 2011.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Gengivite experimental no homem. **The Journal of Periodontology**, v. 36, n. 3, p. 177-187, 1965.
- LONGO, J. P. F.; DE AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Archives of Oral Research**, v. 6, n. 3, 2010.
- LOUREIRO, R. J. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Portuguesa Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- MACIEL, M. V. O. B., ALMEIDA, A. R., MACHADO, M. H., DE MELO, A. P. Z., DA ROSA, C. G., DE FREITAS, D. Z., NORONHA, C. M., TEIXEIRA, G. L., DE ARMAS, R. D., BARRETO, P. L. M. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Essential oil as a reducing agent for the green synthesis of silver nanoparticles. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 45-54, 2019.

MAHMOUDI, H.; *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 154, 2018.

MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 43-48, 2004.

MAROUF, N. *et al.* Association between periodontitis and severity of Covid-19 infection: A case-control study. **Journal Clinical Periodontology**, p. 1-9, 2021.

MEALEY, B. L. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, p. S26-S31, 2006.

MIMA, E. G. *et al.* Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, p. E380-E388, 2012.

MIRZAHOSSEINIPOUR, M.; *et al.* Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101639, 2020.

MOMBELLI, A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 85-96, 2018.

MOMBELLI, A.; *et al.* Suspected periodontopathogens in erupting third molar sites of periodontally healthy individuals. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, n. 1, p. 48-54, 1990.

NANDA, T.; *et al.* Root conditioning in periodontology – revisited. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 356-358, 2014.

NARCISO, A. M.; *et al.* Antimicrobial green silver nanoparticles in bone grafts functionalization for biomedical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102074, 2021.

NAZIR, M. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. **The Scientific World Journal**, 2020.

NUNES, M. R.; da ROSA, C. G.; BORBA, J. R.; SANTOS, G. M.; FERREIRA, ANA LETÍCIA ANDRADE; BARRETO, PEDRO LUIZ MANIQUE. **Zein nanoparticles: bioactive compounds and controlled delivery**. In: Sougata Jana; Subrata Jana. (Org.). *Nanoengineering of Biomaterials Drug Delivery & Biomedical Applications*. 1ed.: John Wiley & Sons, 2022, p. 411-436.

OLIVEIRA, C. L.; *et al.* The effectiveness of photodynamic therapy in non-surgical periodontal treatment. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 6, p. 275-279, 2017.

PAGONIS T. C.; *et al.* Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 322-328, 2010.

PERNI, S.; *et al.* Nanoparticles: their potencial use in antibacterial photodynamic therapy, **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 712-720, 2011.

PRATTEN, J.; *et al.* Staphylococcus aureus accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 8, p. 633-637, 2001.

RAJESHWARI, H. R.; *et al.* Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. **Journal of Controlled Release**, v. 307, p. 393-409, 2019.

RIA, S. A.; FERDOUS, T.; ARAFAT, K. Y. A.; M. JAHAN, S. Pulp refining in improving degree of substitution of methylcellulose preparation from jute Pulp. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 2431–2439, 2022.

RIBEIRO M. S.; *et al.* **Terapia fotodinâmica antimicrobiana: aplicações na odontologia.** São Paulo: Virtual C, 2005.

ROSE, L. R.; MEALEY, B. L.; GENCO, R. J.; COHEN, D. W. **Periodontia, medicina, cirurgia e implantes.** São Paulo: Editora Santos, 2007.

SALDANHA, D. M. S; SOUZA, M. B. M.; RIBEIRO, J. S. O uso indiscriminado dos antibióticos: uma revisão narrativa da literatura. **Revista Interfaces da Saúde**, v. 5, p. 12-37, 2018.

SANTANA, P. F. F.; *et al.* Terapia fotodinâmica como adjunto ao tratamento periodontal não cirúrgico da periodontite crônica: revisão sistemática. **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, 2016.

SANTIN, G. C.; *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SANZ, M.; *et al.* Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report. **Journal Clinical Periodontology**, v. 47, p. 268-288, 2020.

SEYAMA, M.; *et al.* Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 6, p. 165731, 2020.

SHERWANI, M. A.; *et al.* Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of *C. albicans* infection in BALB/c mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131684, 2015.

SILVA L. A.; *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **Jornal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 360-366, 2012.

SILVESTRE, A. L. P.; *et al.* Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, 2021.

SMILEY, C. J.; *et al.*, Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. **Journal American Dental Association**, v. 146, n. 7, p. 525-535, 2015.

SONG, J.; GAO, Z.; LI, M. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy for chronic periodontitis undergoing scaling and root Planing: A Meta-analysis of randomized controlled trials. **Optics and Laser Technology**. v. 149, 2022.

SONG, Y.; GAO, L.; LI, L.; ZHENG, Q. Influence of gliadins on rheology of methylcellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 98 – 104, 2010.

SURESH S.; *et al.* Low-level laser therapy: A biostimulation therapy in periodontics. **SRM Journal of Research in Dental Sciences**, v. 6, n. 1, 2015.

TAKASAKI, A. A.; *et al.* Application antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and Peri-implant diseases. **Periodontology 2000**, v. n. 51, p. 109-140, 2009.

TAN, O. L.; SAFFI, S. H.; RAZALI, M. Commercial local pharmacotherapeutics and adjunctive agents for nonsurgical treatment of periodontitis: a contemporary review of clinical efficacies and challenges. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, 2020.

TAY, S. H.; PANG, S.C.; CHIN, S.F. S.H A facile approach for controlled synthesis of hydrophilic starch-based nanoparticles from native sago starch. **Starch/Stärke** v. 64, p. 984-990, 2012.

THEILADE, E.; WRIGHT, W. H.; JENSEN, B. S.; ÖE, H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. **Journal Periodontal Research**, v. 1, p. 1-13, 1966.

TRIBBLE, G. D.; LAMONT, R. J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. **Periodontology**, v. 52, p. 68–83, 2010.

TROIANO, G.; *et al.* Can Inspection of the Mouth Help Clinicians Diagnose Crohn's Disease? A Review. **Oral Health Preventive Dentistry**, v. 15, p. 223-227, 2017.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. Lasers in Surgery and Medicine. **The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 33, n. 5, p. 311-319, 2003.

WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **International dental journal**, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1994.

XIAO, Shimeng *et al.* Novel multifunctional nanocomposite for root caries restorations to inhibit periodontitis-related pathogens. **Journal of dentistry**, v. 81, p. 17-26, 2019.

YAO, Q.W.; *et al.* Association of periodontal disease with oral cancer: a meta analysis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 7, p. 7073-7077, 2014.

ANEXO

Anexo 1 – Capítulo de livro “O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associada a nanofotossensibilizantes no combate aos patógenos periodontais: uma revisão sistemática”

10

O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associada a nanofotossensibilizantes no combate aos patógenos periodontais: uma revisão sistemática

- | **Magali Parizzi**
UNIPLAC
- | **Leonardo Berwig**
UNIPLAC
- | **Cleonice Gonçalves da Rosa**
UNIPLAC
- | **Anelise Viapiana Masiero**
UNIPLAC