**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

ISABELLA LUIZ SUZUKI

**Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação
fotodinâmica**

**São Carlos
2015**

ISABELLA LUIZ SUZUKI

**Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação
fotodinâmica**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação do Instituto de Física de São
Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato

Versão Original

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Suzuki, Isabella Luiz

Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada
para inativação fotodinâmica / Isabella Luiz Suzuki;
orientador Vanderlei Salvador Bagnato -- São Carlos,
2015.

117 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Curcumina natural. 2. PLGA. 3. Nanopartículas.
4. Inativação fotodinâmica. I. Bagnato, Vanderlei
Salvador, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabella Luiz Suzuki

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 25/01/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Vanderlei Salvador Bagnato

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Fernanda de Freitas Anibal

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dr(a). Maria Vitoria Lopes Badra Bentley

Instituição: (FCFRP/USP)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida, por não me abandonar em nenhum momento da minha trajetória, por me manter forte nos meus objetivos com saúde e fé, e por me amparar sempre que necessitei!

Aos meus pais, Cecília e Daniel, por me apoiarem sempre nas minhas decisões, por me incentivarem a estudar e aprimorar meus conhecimentos como profissional, por todo amor e dedicação na minha educação como ser humano, pelo exemplo de pessoas, por me acompanharem todos os dias nessa caminhada, e por me ensinarem a buscar e lutar pelos meus objetivos e sonhos.

Ao meu irmão, Júlio, que apesar de ser pequeno foi e é peça essencial na minha vida, por sua natureza pura e pela sua alegria que faz toda diferença nos meus dias!

Ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, por me aceitar como sua aluna, por todos os ensinamentos e orientação passados a mim sempre com compreensão, dedicação e paciência, pelo exemplo de profissional. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto!

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela colaboração, pelos ensinamentos e por permitir que grande parte deste projeto fosse desenvolvido em seus laboratórios.

À Profa. Dra. Cristina Kurachi, pela colaboração, pelo apoio científico e ajuda desde o início do mestrado.

A minha mentora, Valéria, por não medir esforços para me ajudar quando precisei, principalmente quando surgiram problemas e obstáculos durante o desenvolvimento do projeto, pelo tempo de ensinamento sempre com muita dedicação e paciência, por me acolher no grupo de Gnano e pela grande amizade.

A minha mentora, Thaila, que além de me ajudar a executar e elaborar todos os experimentos na microbiologia se tornou uma grande amiga, essencial não apenas nos ensinamentos dentro do laboratório, mas em todo trajeto do meu mestrado, me ajudando

em todas as horas. Obrigada por toda paciência, por todos os ensinamentos, pelos momentos de risadas e também de choros, e principalmente, obrigada pela sua amizade!

Aos meus amigos, Sebastião e Mari, que sempre me ajudaram, não apenas com tarefas do projeto, mas também nos momentos que mais precisei de amparo. Obrigada por toda ajuda, pelos conselhos, momentos de risadas e descontração, pela companhia e pela amizade de vocês dois!

A Dr. Natalia Inada, por todas as conversas, conselhos e discussões, não somente sobre o projeto, mas também sobre os acontecimentos da vida, por todo aprendizado e paciência. E principalmente, agradeço muito a você por ter me apresentado o grupo de Óptica!

Aos meus familiares, por me apoiarem e acompanharem durante esses dois anos de pesquisa.

Aos meus amigos, que sempre se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso. Principalmente, as minhas amigas Joana e Mariana, por todas as nossas reuniões semanais no Broa, pelas risadas, pelos conselhos, pela companhia e incentivo de sempre!

Aos meus colegas do Laboratório de Biofotônica, por sempre me ajudarem quando precisei.

Ao Instituto de Física de São Carlos (USP) que proporcionou toda a infraestrutura e suporte necessário para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao CNPq, a Capes, à FAPESP (através do CePOF), entre outros apoios, pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados nominalmente, mas que colaboraram de alguma forma, torcendo e contribuindo para que eu conseguisse concluir este trabalho, muito obrigada!

*"Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes".*

Marthin Luther King

RESUMO

SUZUKI, I. L. **Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica**. 2015. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Devido ao uso excessivo de antibióticos houve e ainda há um crescimento no número de cepas resistentes aos medicamentos existentes. Por causa desse crescimento de bactérias multirresistentes, o número de pesquisas que procuram alternativas terapêuticas antibacterianas tem aumentado, e dentre elas está a terapia fotodinâmica antimicrobiana ou inativação fotodinâmica (IFD). A inativação fotodinâmica, utilizada no controle biológico de microrganismos, envolve a ação de um fotossensibilizador (FS), ativado por um comprimento de onda específico, no intuito de oxidar substratos biológicos, resultando em efeito citotóxico. A cúrcuma ou curcumina natural, conhecida como açafrão da terra, consiste em mistura de três curcuminóides: curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. A curcumina apresenta várias propriedades farmacológicas, no entanto, possui solubilidade extremamente baixa em soluções aquosas, que dificulta a sua utilização como agente terapêutico. O presente estudo propôs desenvolver nanopartículas poliméricas de PLGA contendo curcumina natural a fim de melhorar sua solubilidade e estabilidade, e também verificar sua eficácia na inativação fotodinâmica de microrganismos. As nanopartículas PLGA-CURC sintetizadas através da nanoprecipitação resultaram em três sistemas diferentes, com tamanho médio e eficiência de encapsulamento de 172 nm e 70% para PLGA-CURC1, 215 nm e 80% para PLGA-CURC2, e 242 nm e 80% para PLGA-CURC3. Testes de estabilidade mostraram proteção do polímero contra a degradação precoce da curcumina natural. Os ensaios microbiológicos *in vitro* com a solução de curcumina natural, as PLGA-CURC1 e PLGA-CURC2 foram eficientes na inativação da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, e do fungo *Candida albicans*. Porém, a solução apresentou toxicidade no escuro em altas concentrações, ao contrario das nanopartículas. O sistema PLGA-CURC2 com sua carga superficial modificada, gerou o sistema PLGA-CURC3, que inativou efetivamente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Assim, concluiu-se que foi possível deixar a curcumina natural solúvel em água através do encapsulamento em nanopartículas de PLGA, certificar a melhora na estabilidade em meio aquoso (estocagem), além de inativar bactérias e fungo.

Palavras-chave: Curcumina natural. PLGA. Nanopartículas. Inativação fotodinâmica.

ABSTRACT

SUZUKI, I. L. **Viability of natural curcumin nanoencapsulated for photodynamic inactivation.** 2015. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Due to excessive over use of antibiotics there was and still are growth in the number of bacterial strains resistant to existing drugs. Because of the growth of multiresistant bacteria, the number of searches looking for alternatives antibacterial therapeutic has increased, and among them is the antimicrobial photodynamic therapy or photodynamic inactivation (PDI). The photodynamic inactivation used in biological control of microorganisms, involves the action of a photosensitizer (PS), activated by a specific wavelength in order to oxidize organic substrates, resulting in cytotoxic effect. Turmeric or natural curcumin, consists of a mixture of three curcuminoids: curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. Curcumin has various pharmacological properties, however, has extremely low solubility in aqueous solutions, which makes the use as therapeutic agent harder. The present study aims to develop polymeric PLGA nanoparticles containing natural curcumin in order to improve their solubility and stability, and also verify its efficacy in photodynamic inactivation of microorganisms. The PLGA-CURC nanoparticles was synthesized by nanoprecipitation, resulting in three different systems, with an average size of 172 nm and 70% encapsulation efficiency for PLGA-CURC1, 215 nm and 80% for PLGA-CURC2, and 242 nm and 80 % for PLGA-CURC3. Stability tests showed the polymer protected the natural curcumin against premature degradation. Microbiological tests *in vitro* with the natural curcumin solution, the PLGA-CURC1 and PLGA-CURC2 were efficient in the inactivation of Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*, and fungus *Candida albicans*. However, the solution presented dark toxicity at high concentrations, unlike the nanoparticles. The PLGA-CURC2 system with a modified surface charge, gave the PLGA-CURC3 system, which effectively inactivated Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Thus, it was concluded that it was possible to let curcumin water soluble by encapsulation in PLGA nanoparticles, to ensure improved stability in aqueous medium (storage), and to inactivate bacteria and fungus.

Keywords: Natural curcumin. PLGA. Nanoparticles. Photodynamic inactivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica, incluindo o diagrama de Jablonski. O FS no estado fundamental singleto, é excitado convertendo-se para o estado singleto excitado e, posteriormente, para o estado tripleto. Este estado tripleto pode interagir com o oxigênio molecular em duas vias: tipo I (formação de espécies reativas de oxigênios - EROs) e tipo II (formação de oxigênio singleto).	29
Figura 2 - Fórmula estrutural dos compostos curcuminóides presentes na cúrcuma.	35
Figura 3 - Tipos de nanopartículas poliméricas biodegradáveis: de acordo com a organização estrutural as mesmas são classificadas como nanocápsulas e nanoesferas. A molécula de fármaco é aprisionada no interior das nanopartículas ou adsorvida na superfície.	37
Figura 4 - Hidrólise de nanopartículas de PLGA: nanopartículas de PLGA são biologicamente hidrolisadas em meio ácido, resultando em ácido láctico e glicólico. Estes produtos de hidrólise são metabolizados no ciclo do Krebs.	39
Figura 5 - Metodologias diferentes para síntese de nanopartículas de PLGA: A maioria das nanopartículas de PLGA são sintetizadas por difusão-emulsão, evaporação de solventes e nanoprecipitação.	40
Figura 6 - Esquema da diluição seriada feitas com a solução de microrganismo e seu plaqueamento em placas Petri.	54
Figura 7 - Nanopartículas PLGA-CURC1 em água MilliQ (1 mg/mL).	60
Figura 8 - A) Imagem das PLGA-CURC1 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). (B) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC1. (C) Imagem das PLGA-CURC2 em microscopia eletrônica de varredura. (D) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC2. (E) Imagem das PLGA-CURC3 em microscopia eletrônica de varredura. (F) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC3.	64
Figura 9 - Curva de liberação da curcumina natural da síntese 1, PLGA-CURC1.	65
Figura 10 - Curva de liberação da síntese 2, PLGA-CURC2.	66
Figura 11 - Esquema da cinética de liberação e reposição de moléculas de curcumina natural encapsuladas nas nanopartículas com o meio líquido.	67
Figura 12 - Decaimento da concentração de curcumina natural em solução aquosa e PLGA-CURC1 frente a dois tempos de iluminação.	71
Figura 13 - Absorbâncias normalizadas das três amostras de curcumina natural frente diversos tempos de iluminação.	72
Figura 14 - Espectros de absorção em função do tempo de iluminação. (A) solução aquosa de curcumina natural, (B) PLGA-CURC2.	73
Figura 15 - Espectro de absorbância normalizada da amostra de curcumina natural com diferentes concentrações de oxigênio em diferentes tempos de iluminação.	75
Figura 16 - Amostras de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural estocadas à temperatura ambiente num intervalo de 31 dias.	77
Figura 17 - Amostras de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em geladeira (4°C) num intervalo de 31 dias.	77
Figura 18 - Amostras de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em estufa à 37°C num intervalo de 39 dias.	80

Figura 19 - Amostras de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em geladeira à 4°C num intervalo de 39 dias.	81
Figura 20 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora e 0,1 µg/mL.	84
Figura 21 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas e 1 µg/mL.	85
Figura 22 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	86
Figura 23 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 hora a 7 µg/mL.	86
Figura 24 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 0,5 mg/mL.	87
Figura 25 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 hora a 0,5 mg/mL.	87
Figura 26 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	89
Figura 27 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.	89
Figura 28 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizada com incubação de 1 hora a 0,5 mg/mL.	90
Figura 29 - Viabilidade celular da bactéria <i>S. aureus</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizada com incubação de 5 horas a 0,5 mg/mL.	90
Figura 30 - Viabilidade celular da bactéria <i>E.coli</i> com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas e 1 µg/mL.	93
Figura 31 - Viabilidade celular da bactéria <i>E.coli</i> com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	93
Figura 32 - Viabilidade celular da bactéria <i>E.coli</i> com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.	94
Figura 33 - Viabilidade celular da bactéria <i>E.coli</i> com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 0,5 mg/mL.	94
Figura 34 - Viabilidade celular da bactéria <i>E.coli</i> com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 0,5 mg/mL.	95
Figura 35 - Viabilidade celular da bactéria <i>E. coli</i> com os tratamentos de PLGA-CUR3 e PLGA-CURC3 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	96
Figura 36 - Viabilidade celular da bactéria <i>E. coli</i> com os tratamentos de PLGA-CUR3 e PLGA-CURC3 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.	96
Figura 37 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 0,1 µg/mL.	98
Figura 38 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 1 µg/mL.	98
Figura 39 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	99
Figura 40 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.	100

Figura 41 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 0,5 mg/mL.	100
Figura 42 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 0,5 mg/mL.	101
Figura 43 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.	102
Figura 44 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.	103
Figura 45 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 0,5 mg/mL.	103
Figura 46 - Viabilidade celular do fungo <i>C. albicans</i> com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 0,5 mg/mL.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection
CN: Curcumina natural
DMSO: Dimetilsulfóxido
EROS: Espécies reativas de oxigênio
FS: Fotossensibilizador
Hp: Hematoporfirina
HpD: Derivado hematoporfirina
IFD: Inativação fotodinâmica
IFSC: Instituto de Física de São Carlos
kDa: Kilodalton
LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED: Diodos emissores de luz (do inglês: light emitting diode)
L(-)FS(-): Grupo controle
L(-)FS(+): Grupo controle do fotossensibilizador
L(+)FS(-): Grupo controle da luz
L(+)FS(+): Grupo inativação fotodinâmica
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
NPs: nanopartículas
PDI: Inativação fotodinâmica (do inglês: Photodynamic Inactivation)
PDT: Terapia fotodinâmica (do inglês: Photodynamic Therapy)
PLGA: Poli (ácido láctico co-glicólico)
PLGA-CURC: Nanopartículas contendo curcumina natural
PS: Fotossensibilizador (do inglês: Photosensitizer)
TFD: Terapia fotodinâmica
UV: Ultravioleta
°C: Grau Celsius
g: Grama
mg: Miligrama
mL: Mililitro
nm: Nanômetro
µg: Micrograma
mm: Milímetro
g/mL: Gramas por mililitro
g/mol: Gramas por mol
g/cm³: Gramas por centímetro cúbico
mg/mL: Miligrama por mililitro
µg/mL: Micrograma por mililitro
mol/mL: Mols por mililitro
UFC/mL: Unidades formadoras de colônia por mililitro
mW/cm²: Miliwatts por centímetro quadrado
J/cm²: Joules por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Doenças infecciosas e tratamentos	25
2.2 Terapia fotodinâmica e inativação fotodinâmica	27
2.3 Fonte de luz	31
2.4 Fotossensibilizadores	32
2.5 Curcumina e curcuminóides	34
2.6 Sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fotossensibilizadores	36
2.7 O uso de nanopartículas na TFD	38
2.8 Nanopartículas de Poli (ácido láctico co-glicólico) PLGA	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivos gerais	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Solução de curcumina	45
4.2 Síntese de nanopartículas de poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA)	45
4.2.1 Reagentes e Concentrações	45
4.2.2 Procedimento Experimental	46
4.3 Caracterização das nanopartículas	47
4.3.1 Curva de calibração	47
4.3.2 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta	47
4.3.3 Tamanho e morfologia das nanopartículas	48
4.3.4 Eficiência do encapsulamento das nanopartículas	48
4.3.5 Liberação dos curcuminóides das nanopartículas de PLGA	49
4.4 Estabilidade das nanopartículas	50
4.4.1 Degradação com luz azul (450 nm)	50
4.4.2 Degradação com diferentes concentrações de O ₂	50
4.4.3 Degradação com diferentes tempos e temperatura	51
4.5 Fonte de luz	51
4.6 Microrganismos	51
4.7 Inativação fotodinâmica dos microrganismos	52
4.7.1 Preparo das bactérias para os ensaios <i>in vitro</i>	52
4.7.2 Preparo do fungo para os ensaios <i>in vitro</i>	52
4.7.3 Condições experimentais avaliadas com as nanopartículas e solução livre de curcumina natural	52
4.7.4 Análise da eficácia dos testes <i>in vitro</i> em cada condição experimental	54
4.7.5 Procedimento para análise da eficácia dos testes <i>in vitro</i> em cada condição experimental variando as condições experimentais	55
4.7.6 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> sem luz e sem fotossensibilizador (L-FS-)	55

4.7.7 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> sem luz e com fotossensibilizador (L-FS+)	56
4.7.8 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> com luz e sem fotossensibilizador (L+FS-)	56
4.7.9 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> com luz e com fotossensibilizador (L+FS+)	56
4.7.10 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Sínteses, caracterização e estabilidade das nanopartículas	59
5.1.1 Sínteses das nanopartículas	59
5.1.2 Caracterização das nanopartículas	61
5.1.3 Estabilidade das formulações e solução livre de curcumina natural	71
5.2 Inativação fotodinâmica dos microrganismos	83
5.2.1 Bactéria Gram-positiva – <i>Staphylococcus aureus</i>	83
5.2.2 Bactéria Gram-negativa – <i>Escherichia coli</i>	91
5.2.3 Fungo – <i>Candida albicans</i>	97
6 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de cepas bacterianas resistentes é uma das ameaças mais preocupantes para a saúde pública ao longo dos últimos anos. Devido ao uso excessivo de antibióticos houve e ainda há um crescimento no número de cepas resistentes aos medicamentos já existentes.(1) Esse aumento na resistência bacteriana coloca em risco o período conhecido como "a era dos antibióticos".(2) A replicação das bactérias é um fenômeno extremamente rápido e uma mutação que as torna resistentes a um antibiótico, acaba se tornando predominante em praticamente toda população microbiana.

A prescrição inadequada de antibióticos para doenças virais, o fracasso de alguns pacientes em completar seu tratamento e o uso generalizado de antibióticos em alimentos para animais, ajudam agravar o problema, selecionando cepas mais resistentes.(3-4) O crescimento de bactérias multirresistentes tem impulsionado um aumento no número de pesquisas que procuram uma alternativa terapêutica antibacteriana, e dentre elas está a terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica antimicrobiana ou inativação fotodinâmica é considerada uma alternativa para tratamento de infecções resistentes, pois além de causar a morte do microrganismo, possui a vantagem de não provocar a seleção de cepas resistentes, isto porque seu mecanismo está relacionado à oxidação, um fenômeno que ocorre naturalmente no interior das células bacterianas.(5-7)

A terapia fotodinâmica (TFD) ou inativação fotodinâmica (IFD) é uma modalidade terapêutica que combina a utilização de luz em um comprimento de onda específico, o oxigênio molecular (O_2) e compostos fotossensíveis que juntos causam a morte de células-alvo.(6) O acúmulo de um agente fotossensibilizador (FS) em tecido alvo, com a luz no comprimento de onda correto para excitar o FS, na presença de oxigênio, causa a excitação do FS que transfere energia ou elétrons para o oxigênio em estado molecular presente no meio que forma oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), ambos responsáveis pelos danos causados nas células-alvo.(7) Um FS ideal para uso na TFD deve exibir algumas características como ausência de toxicidade no escuro; não ser cancerígeno ou mutagênico; ser ativado em comprimento de onda específico; não causar dor durante o tratamento; não apresentar efeitos secundários e não causar efeitos deletérios sobre o tecido normal (sadio).(8)

A curcumina é um composto fenólico natural amarelo, extraída a partir da cúrcuma (açafrão da terra), *Curcuma longa* Linn, que pode ser utilizada como fotossensibilizador. A curcumina natural sintetizada pela PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brasil, é em uma

mistura de três curcuminóides: curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Durante muitos séculos, a curcumina em sua forma bruta foi utilizada como suplemento dietético e especiarias, bem como componente de muitos medicamentos tradicionais asiáticos.(9) É um composto antioxidante natural e apresenta muitas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana e anticancerígena em estudos pré-clínicos e clínicos. Os curcuminóides têm sido estudados, pois possuem uma gama de propriedades farmacológicas, especialmente atividade antitumoral.(9) A curcumina também pode ser aplicada na TFD, pois possui comportamento de FS. É ativada em um específico comprimento de onda (450 nm), e na presença de oxigênio, produz oxigênio singlete e EROs, causando a morte das células. Na inativação fotodinâmica de microrganismos, a curcumina apresenta um efeito bactericida e fungicida, por isso, pode ser aplicada em tratamentos alternativos, principalmente em infecções localizadas superficiais.(10) A curcumina pode ser sintética ou naturalmente extraída, podendo ser apenas ela o composto ativo ou uma mistura dos três ativos. A curcumina natural, utilizada nesse projeto, fornecida pela PDTPharma, é natural, constituída de uma mistura dos três curcuminóides.

A curcumina pode passar livremente através das membranas celulares devido à sua alta lipofilicidade ($\log P = 2,5$), porém, por ser um composto extremamente lipofílico, a molécula possui baixa solubilidade em água (praticamente insolúvel) e sofre rápida degradação na presença de luz e em meio aquoso. Estas características dificultam sua utilização na terapêutica.(11) Uma das principais estratégias utilizadas para superar tais limitações físico-químicas da curcumina e aumentar a sua biodisponibilidade são baseadas no carregamento do composto em veículos chamados de nanocarregadores ou nanotransportadores. Estes sistemas possuem tamanhos da ordem de nano (10^{-9} m) ou micrometros (10^{-6} m) e têm se mostrado eficientes para o controle dos parâmetros físico-químicos e entrega dirigida de agentes terapêuticos.(12) Os nanocarregadores aumentam o tempo de circulação do composto encapsulado, aumentando, conseqüentemente, seu acúmulo no local desejado. Nas últimas décadas, muitas tecnologias foram desenvolvidas nesta área, tais como as nanopartículas poliméricas, micelas, ciclodextrinas, dispersões sólidas, emulsões lipídicas, lipossomas, péptidos, entre outros.(12)

Nanopartículas de polímeros biodegradáveis têm sido utilizadas para melhorar o valor terapêutico de fármacos insolúveis em água por aumentar a biodisponibilidade, a solubilidade e o tempo de retenção do princípio ativo.(13) O encapsulamento de drogas pode aumentar sua eficácia, sua especificidade (quanto ao alvo), tolerabilidade e seu índice terapêutico.(14–18) Estes nanomedicamentos possuem vantagens em termos de proteção contra a degradação

prematura. Além disso, promovem liberação controlada do fármaco, mantendo constante a concentração sanguínea da droga (faixa terapêutica) por um período prolongado, assegurando maior biodisponibilidade e reduzindo os efeitos colaterais. Isso realça a adesão do paciente ao tratamento com menor número de dosagens requeridas.(19-20) As propriedades destes nanossistemas podem ser controladas modificando-se parâmetros como tamanho da partícula, carga superficial, modificação da superfície e hidrofilicidade.(21) As nanopartículas poliméricas possuem muitas outras vantagens para aplicações, como veículo de entrega, pois possuem perfil de liberação controlada, tamanho subcelular (escala de nanômetro) e biocompatibilidade com o tecido e células.(22) Além disso, são atóxicas, biodegradáveis, não imunogênicas, não inflamatórias, não mutagênicas, e podem ser aplicadas em vários tipos de moléculas, tais como medicamentos, proteínas, péptidos, ou ácidos nucleicos.(23-24) Os parâmetros físico-químicos das nanopartículas, como tamanho, carga da superfície, tipo de superfície e de hidrofilicidade, influenciam na farmacocinética da droga e na sua biodisponibilidade.(25)

A imobilização de FS em nanopartículas consiste em uma grande alternativa para superar as dificuldades encontradas com o FS livre. Na maioria das vezes, as nanopartículas são utilizadas como transportadores de FS hidrofóbicos, melhorando a dispersão destes em sistemas aquosos.(26) Um sistema de entrega ideal para FS deve permitir o seu acúmulo seletivo no tecido desejado e fornecer uma concentração terapêutica maior para as células doentes se comparadas às células normais. A nanopartícula deve ser capaz de incorporar o FS sem que ele perca ou altere sua atividade.(27)

O poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA) é um dos polímeros biodegradáveis utilizados com mais sucesso, pois a sua hidrólise conduz aos metabólitos monômeros, ácido láctico e ácido glicólico, que são endógenos e metabolizados pelo corpo através do ciclo de Krebs, facilitando sua excreção.(28) Além disso, o PLGA é aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) e pela EMA (European Medicine Agency). Trabalhos recentes demonstraram que as nanopartículas de PLGA são capazes de melhorar a biodisponibilidade da curcumina para administração oral.(29) Apesar dos avanços na área, a utilização de nanopartículas poliméricas de PLGA contendo curcumina natural para aplicação junto à técnica de inativação fotodinâmica, para fins antimicrobianos, tem sido pouco explorada.

Portanto, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver nanopartículas poliméricas de PLGA contendo curcumina natural para torná-las solúveis em meio aquoso e melhorar sua biodisponibilidade nesse meio, fornecendo proteção contra degradação físico-química e aumentando sua estabilidade. Além disso, foi objetivo do estudo verificar se a

atividade fotodinâmica do FS em microrganismos seria mantida ou melhorada. As nanopartículas foram preparadas através do método de nanoprecipitação (30) e foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas e de microscopia eletrônica. A estabilidade físico-química destes novos sistemas foi avaliada e comparada com a CN livre. Finalmente, para medir a eficácia *in vitro*, o FS encapsulado foi testado em bactérias e fungos, e os resultados obtidos foram comparados com os resultantes da solução aquosa de curcumina natural.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças infecciosas e tratamentos

Apesar de considerável o progresso obtido nos tratamentos de infecções, ainda é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos no mundo, (31) o que pode levar ao fim de um extenso período (últimos cinquenta anos) chamado de “era do antibiótico”.(2,32) Os antibióticos têm sido usados no tratamento de doenças infecciosas desde 1940, quando um grupo de cientistas na Universidade de Oxford obteve sucesso com o primeiro teste clínico da penicilina. Entretanto, nas últimas décadas, devido ao seu uso constante, houve aumento do desequilíbrio da ecologia humana e da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, considerados como um dos maiores problemas da atualidade. A propagação de cepas bacterianas multirresistentes é uma das ameaças mais preocupantes para a saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as infecções microbianas são a causa de morte de cerca de 45% de toda a população.(35-36)

As bactérias possuem rápida replicação, por isso, uma mutação que contribua para o microrganismo sobreviver na presença de um antibiótico, torna-se rapidamente predominante em toda a população microbiana. Com isso, há um aumento, cada vez maior, de cepas resistentes aos antibióticos já existentes entre as bactérias patogênicas. Segundo Jori et al.,(35) a resistência microbiana pode ser atribuída a vários fatores como: prescrição inapropriada de antimicrobianos, uso excessivo e inapropriado, não adesão correta dos pacientes ao tratamento, adição generalizada de antibióticos às rações administradas aos animais, alta taxa de transmissão de microrganismos pelo aumento das viagens globalizadas, crescimento da pobreza nos países do terceiro mundo e ampla variedade de mecanismos de adaptação das células microbianas.

Desde a descoberta da penicilina, entre os anos 1920 e 1930, houve um aumento no desenvolvimento e no uso de novos antimicrobianos em todo o mundo. Embora os antibióticos tenham salvado muitas vidas, a sua utilização generalizada e indiscriminada resultou na geração de outros problemas: aumento do índice de mortalidade da população mundial relacionada às infecções causadas por microrganismos multirresistentes; elevada toxicidade da droga, ou seja, a droga deve exibir inativação dos microrganismos, sem afetar as células do hospedeiro; longos períodos de internação e aumento nos custos hospitalares e da saúde pública.(38-39)

A resistência microbiana refere-se aos microrganismos resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de um microrganismo *in vitro* na presença de concentrações de tratamento de antimicrobianos, ou quando são resistentes a duas ou mais classes de drogas às quais seriam normalmente sensíveis.(34,38) O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural que se segue devido à introdução de agentes antimicrobianos na clínica. Um dos primeiros aparecimentos de resistência microbiana ocorreu após o uso da penicilina, antibiótico descoberto em 1929 por Alexander Fleming, que observou inibição de estafilococos em uma placa de ágar contaminada pelo fungo *Penicillium* sp. Em 1950, foram encontrados os primeiros registros de surtos por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando, na década seguinte, surgiram os primeiros casos de resistência às recém descobertas penicilinas beta-lactâmicas, como a meticilina. No final da década de 1970, então, reconheceu-se as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina como uma pandemia.(41-42) Atualmente, 95% dos isolados de *S. aureus* são resistentes a diversos antibióticos como a penicilina, ampicilina, meticilina e vancomicina.(41)

O mecanismo de defesa e resistência das bactérias está relacionado com sua capacidade de transmitir seus genes entre populações da mesma espécie e até de espécies diferentes.(42–44) Essa herança hereditária de serem resistentes às drogas é carregada pelos plasmídeos (DNA dupla fita circular) que se reproduzem independente do DNA cromossômico. Assim, alguns plasmídeos podem ser transferidos entre células microbianas em uma mesma população ou entre populações microbianas diferentes que estejam relacionadas.(41,44) Por isso, muitos estudos são desenvolvidos para conhecer os diversos microrganismos resistentes e também entender os seus mecanismos de resistência.

Mesmo que a comunidade científica conheça bastante os microrganismos resistentes e seus mecanismos, a descoberta de novos antimicrobianos tem sido algo limitado, pois desde 1970 não há o desenvolvimento de nenhuma nova classe que combata doenças infecciosas.(45) Atualmente, o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano tem sido acompanhado pelo aparecimento da resistência de uma ou mais espécie microbiana.(46-47) Como resultado, hoje há uma grande quantidade de pacientes com infecções, para as quais não existem tratamentos eficazes e, quando existem, o alto custo das drogas dificulta e restringe os número de pessoas tratadas.(36,48)

A incidência de infecções causadas por fungos também apresentou um crescimento considerável nos últimos vinte anos, devido ao aumento do uso de drogas antineoplásicas e imunossupressoras, antibióticos de largo espectro e implantação de enxertos. Pacientes

queimados, com pancreatite, portadores de neutropenia ou AIDS também possuem maior predisposição para contrair infecções por fungos.(51-52) Dentre as infecções causadas por leveduras, a forma mais expressiva é a candidíase causada por *C. albicans*, que possui prevalência de 60% dentre os isolados clínicos provenientes de micoses. Outras espécies de *Candida* sp. apresentam menores prevalências, porém, possuem características distintas de patogenicidade, como a elevada resistência a antifúngicos demonstrada pela *C. krusei*.(53-54) A maioria das infecções fúngicas requerem prolongados tratamentos antimicrobianos e estão associadas, normalmente, a sequelas após tratamento e aumento no tempo de internação.(50)

O desenvolvimento de novos antibióticos deve ser continuado, porém, as experiências de décadas passadas mostraram que novos antibióticos podem ser efetivos, mas somente por um período de tempo, dificultando o controle e o tratamento. Diante disso, torna-se imprescindível e necessário desenvolver novas estratégias que sejam eficazes e modalidades terapêuticas para o tratamento e controle dessas infecções. Os estudos de resistência bacteriana geralmente são baseados em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e fungos leveduriformes, (53-54) por isso, o número de pesquisas nessa área tem aumentado com o passar dos anos.

2.2 Terapia fotodinâmica e inativação fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade que combina o uso de luz, oxigênio molecular (O_2) e fotossensibilizador (FS) para causar morte às células-alvo.(6) É baseada no acúmulo específico de um agente fotossensibilizante em um tecido específico que, posteriormente é ativado por luz de comprimento de onda que coincida com o espectro de absorção do FS, gerando oxigênio singleto e outras espécies reativas tóxicas a partir do oxigênio molecular, responsáveis pela injúria das células-alvo.(7)

As primeiras experiências com o tratamento fotodinâmico datam aproximadamente de 1900, e foram relatadas por Raab e Von Tappeiner, que observaram que a exposição ao corante alaranjado de acridina associado à luz poderia ser letal para protozoários como o paramécio. Nem a luz nem o corante, isoladamente, tiveram qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas, associados, foram altamente citotóxicos.(55) Em 1907, Von Tappeiner e Jodlbauer publicaram um livro-texto sobre essa terapia, definida como processo de fotossensibilização dependente de oxigênio, no tratamento de tumor cutâneo e destruição de partículas infecciosas. Descreveram suas experiências com eosina tópica 5% e luz artificial para tratamento de câncer cutâneo não melanoma e de outras dermatoses, como lúpus vulgar e

condiloma plano. Nessa época, postularam a ideia de que a eosina, assim como a acridina, depois de incorporada à célula, poderia produzir reação citotóxica quando exposta à fonte de luz adequada, na presença de oxigênio.(55)

No início dos anos 60, uma nova droga foi sintetizada a partir da purificação da hematoporfirina (Hp), chamada de derivado hematoporfirina (HpD). Após resultados promissores de estudos feitos com ratos e a preferência de corantes em se acumular nos tumores transplantados, Lipson e Schwartz realizaram o tratamento em uma paciente portadora de câncer de mama, utilizando o derivado de hematoporfirina e irradiação seletiva. Esse fato marcou o início da terapia fotodinâmica como tratamento clínico do câncer.(41,56) Desde então, os estudos progrediram e a metodologia foi aprovada para tratamento de alguns tipos de câncer pelo FDA (Food and Drug Administration).(57-59) Apesar das descobertas e dos grandes avanços, o potencial da inativação fotodinâmica como tratamento contra doenças causadas por microrganismos não foi explorado por várias décadas devido principalmente à descoberta dos antibióticos, que acreditavam ser o tratamento para a cura das doenças de origem bacteriana.(35) Em contrapartida, houve um rápido aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, divergindo das expectativas da comunidade científica.(41)

Atualmente, a inativação fotodinâmica é utilizada como opção de tratamento de infecções microbianas locais, principalmente na área dental e dermatológica. Isto possibilita a diminuição do uso de antimicrobianos para esses tipos de infecções resguardando a utilização de antibióticos para infecções generalizadas (ou septicemia), diminuindo o aparecimento de novos microrganismos resistentes.(4,35,57–59)

O mecanismo de ação da TFD (Figura 1) é , atualmente, explicado por dois tipos de reações: reações tipo I e tipo II.(60) Na reação tipo I ocorre transferência de elétrons entre o FS no seu estado tripleto excitado e os componentes do sistema (substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas), gerando assim, íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados (radicais livres reativos ou íons radicais).(61)

Figura 1- Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica, incluindo o diagrama de Jablonski. O FS no estado fundamental singlete, é excitado convertendo-se para o estado singlete excitado e, posteriormente, para o estado tripleto. Este estado tripleto pode interagir com o oxigênio molecular em duas vias: tipo I (formação de espécies reativas de oxigênios - EROs) e tipo II (formação de oxigênio singlete).

Fonte: Adaptada de DENIS et. al. (62)

A maioria destes radicais reage instantaneamente com o oxigênio, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila ($-OH$). (61,63) As reações decorrentes do fotoprocesso tipo I incluem remoção de hidrogênio de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios presentes na membrana, isto afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade aos íons. (63)

Na reação tipo II, ocorre transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio, gerando oxigênio singlete (1O_2), um agente altamente citotóxico. (63) O 1O_2 gerado pode reagir com lipídeos insaturados e proteínas (principais constituintes das membranas biológicas), aminoácidos e ácidos nucleicos. As reações fotooxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido alvo via necrose ou apoptose. (61,63) As reações do tipo II tem o efeito citotóxico do oxigênio singlete, que é um agente oxidante não específico, que possui reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas, provocando oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. (64) As células acabam morrendo por não possuírem um mecanismo de defesa contra esta molécula. (65)

Ao selecionar um determinado fotossensibilizador para uso na TFD, o espectro de absorção óptica, isto é, os comprimentos de onda nos quais este agente é capaz de absorver, é uma das primeiras características que devem ser analisadas, pois como mencionado anteriormente, é necessário que o cromóforo (qualquer substância capaz de absorver luz)

absorva a energia da fonte de luz para poder passar pelo processo que possibilita sua ação fotodinâmica. Conhecendo a faixa do espectro eletromagnético na qual o composto absorve luz, é possível escolher então, a fonte de ativação adequada para obtenção do efeito fotodinâmico.(61,66)

A aplicação da terapia fotodinâmica para inativar microrganismos é considerada uma abordagem alternativa para a eliminação de patógenos em infecções localizadas, como por exemplo, cáries, micoses de unha e infecções de pele.(67) Nesse caso, a inativação fotodinâmica baseia-se no princípio da seletividade do microrganismo por um fotossensibilizador, sendo possível destruí-lo quando a luz é exposta após aplicação do FS.(4,58)

O tratamento fotodinâmico de infecções superficiais e localizadas é considerado simples pela acessibilidade da pele para exposição à luz. As doses de luz e o tempo de irradiação normalmente necessários para eliminação do microrganismo, não provocam efeito térmico significativo nos tecidos saudáveis, o que também facilita a técnica, além de que as fontes de luz podem ser de baixo custo (luz não-coerente) e fácil acesso.(35) Os danos fotodinâmicos nos microrganismos geralmente são semelhantes aos danos observados nas células de eucariotos superiores.(68)

A terapia fotodinâmica exibe vantagens em relação aos antimicrobianos, como: largo espectro de ação, uma vez que o fotossensibilizador pode agir sobre mais de um grupo de microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários; eficácia, independente de cepas microbianas resistentes a antibióticos; desenvolvimento de protocolos que apresentem redução dos microrganismos com dano mínimo ao tecido hospedeiro; a não seleção de cepas fotoresistentes após inúmeros tratamentos; disponibilidade de reproduzir formulações que permitam uma entrega específica e liberação controlada do fotossensibilizador na área infectada e uso de uma fonte de luz de baixo custo.(35,69)

Apesar de ser eficiente na redução de diversas espécies microbianas, a inativação fotodinâmica enfrenta alguns desafios quando utilizada contra bactérias Gram-negativas e fungos.(41) Na literatura é mostrado que bactérias Gram-positivas são eliminadas por vários fotossensibilizadores e por doses relativamente baixas de irradiação, o que não acontece para as bactérias Gram-negativas e fungos. Isso acontece devido às diferenças estruturais nas membranas celulares destes microrganismos, e no caso dos fungos, devido ao seu maior volume.(70) As bactérias Gram-positivas apresentam a porção externa da parede celular relativamente mais porosa, permitindo a entrada de fotossensibilizadores neutros ou aniônicos, e assim, a difusão para locais sensíveis e importantes da célula. Nas Gram-

negativas, a estrutura da membrana externa é complexa, formando uma barreira física (parede celular) e funcional entre a célula e o ambiente, dificultando a penetração de compostos fotossensíveis.(68,69) As leveduras são mais resistentes à inativação fotodinâmica, pois possuem um tamanho maior de célula em relação às bactérias (25 a 50 vezes maior).(4) A presença de membrana nuclear também representa um outro fator de dificuldade da fotoinativação de fungos, pois ela atua como uma barreira adicional na interação microrganismo-fotossensibilizador.(71-72)

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana depende do tipo e concentração do fotossensibilizador, e também é influenciada pelo sítio de ação, que é dependente das características físico-químicas da interação feita com a célula-alvo.(73) Parâmetros importantes do FS para interação estão incluídos: solubilidade em água e lipídios, estabilidade em meio líquido, constante de ionização e outros fatores específicos como as características de absorção de luz e a eficiência de formação do estado tripleto ou produção de oxigênio singleto.(74-75)

2.3 Fonte de luz

Há uma ampla variedade de fontes de luz que podem ser utilizadas nessa modalidade terapêutica, como, por exemplo: os lasers, os diodos, as lâmpadas incandescentes e fluorescentes.(56,76) O aspecto prioritário para escolha de uma fonte de luz é a sua habilidade de excitar o fotossensibilizador, que tenha efeito adverso mínimo nas células não-alvos.(77)

Uma fonte de luz muito utilizada na TFD são os LED (Light-Emitting Diodes), que são diodos que emitem luz quando conectados a um circuito. Esses dispositivos apresentam um reduzido componente térmico e uma banda relativamente estreita em torno de um comprimento de onda.(78) A diferença entre o LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e o LED, é que neste predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação, e nos lasers a emissão é estimulada. Dessa distinção decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos. A luz laser apresenta características especiais em relação à dos LEDs (geração de luz coerente e colimada), que concedem ao dispositivo laser um desempenho geralmente superior, porém com maior custo e, portanto, menor viabilidade. O laser necessita de grande quantidade de energia para geração de luz, enquanto os dispositivos LEDs necessitam de pouca energia, apresentando um largo espectro de luz não-coerente e não-colimada, diferentemente dos lasers. Embora, sejam semelhantes às fontes de luz halógena nesse aspecto, os LEDs apresentam um espectro de emissão mais estreito que

qualquer uma delas, oferecendo um aproveitamento melhor que a luz halógena. Por emitirem bandas de comprimentos de onda razoavelmente estreitas, os LEDs também apresentam uma monocromaticidade relativamente maior que as das lâmpadas.(79)

A susceptibilidade à reação fotodinâmica pode ser maior ou menor dependendo da célula-alvo. Por isso, os protocolos de tratamento, considerando o fotossensibilizador, o tempo de incubação e os parâmetros e tempo de iluminação, devem ser padronizados para cada aplicação da terapia fotodinâmica.

2.4 Fotossensibilizadores

Muitas substâncias possuem o potencial de ser fotossensíveis, porém poucas são utilizadas em testes clínicos e estão disponíveis comercialmente para tratamento fotodinâmico.(84) A maioria dos fotossensibilizadores utilizados na prática clínica e experimental são derivados de um núcleo aromático tetrapirrólico encontrado em vários pigmentos naturais. Eles podem ser classificados baseando-se em suas estruturas químicas, podendo pertencer a várias famílias, como por exemplo, a família das porfirinas, clorofilas, ftalocianinas, corantes, entre outras.(84)

Os fotossensibilizadores são compostos pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz em uma região específica.(35) São considerados os principais veículos da TFD e da IFD, pois quando são iluminados no seu comprimento de onda de absorção, são excitados e conseguem fazer a transferência de energia e/ou de elétrons para gerar produtos reativos que resultam em citotoxicidade. Muitos compostos são estudados para o uso em IFD com potencial ação de FS e vários apresentam diferentes estruturas moleculares e distintas propriedades biofísicas. Por isso, o grande desafio é encontrar um que tenha a habilidade de ser armazenado preferencialmente no interior dos microrganismos, de forma específica, aumentando o poder de destruição e especificidade dos mesmos.(85) Uma das características fundamentais para um FS ideal, é que ele não sofra decomposição rápida causada pela luz, para que não haja destruição do mesmo antes de causar o dano fotodinâmico nas células-alvo.(87-88)

Os fotossensibilizadores podem ser incorporados pelas células malignas (ou microrganismos) e também pelas células normais (do hospedeiro), porém como possuem uma afinidade maior pelas células anormais, permanecem mais tempo em tecidos neoplásicos ou de rápida proliferação. Isso pode ser explicado pelo fato do maior número de vasos

sanguíneos na região, alta permeabilidade vascular e de uma drenagem linfática deficiente nesses tecidos.(88)

Através de estudos em animais, Allison et al.(87) formularam diretrizes e características ideais que um composto fotossensível deveria apresentar para maximizar seu efeito fotodinâmico na TFD: (56,81,84,87,89)

- Ausência de toxicidade;
- Ausência de subprodutos tóxicos;
- Não ser carcinogênico ou mutagênico;
- Ser rapidamente eliminado;
- Apresentar seletividade pelas células-alvo;
- Ativação em comprimento de onda específico;
- Facilidade na administração;
- Não causar dor durante a terapia;
- Boa permeabilidade em membrana citoplasmática;
- Tempo de vida relativamente longo no estado excitado, para permitir a transferência de elétrons e/ou energia para as moléculas de oxigênio;
- Apresentar custo acessível;
- Segurança na utilização, sem efeitos colaterais;
- Não causar efeitos colaterais quando utilizado concomitantemente a outras modalidades terapêuticas;
- Não causar grandes efeitos deletérios no tecido normal.

No protocolo para o fotossensibilizador alguns parâmetros devem ser definidos, como as concentrações e vias de administração utilizadas. A concentração, é um fator de relevância para o sucesso da reação fotodinâmica, deve estar presente em concentrações minimamente tóxicas, sabendo que a concentração escolhida não deve produzir danos ao tecido-alvo antes da ativação pela fonte de luz (mínima toxicidade no escuro).(80) A administração do fotossensibilizador pode ser realizada através de três vias: intravenosa, oral ou tópica.(81) O tempo de incubação também possui grande relevância, pois neste intervalo entre a administração e a iluminação, espera-se que o fotossensibilizador esteja presente no interior das células-alvo, já ultrapassado a barreira da membrana celular.(82-83)

No entanto, alguns problemas prejudicam o desempenho dos FS no processo de IFD e na produção de EROs, dentre eles, destacam-se a formação de agregados e a rápida fotodegradação do FS. A formação de agregados entre as moléculas do FS prejudica a geração

de EROs, pois quando o FS encontra-se na forma agregada, é menos ativo, dificultando o processo de transferência de energia para geração de oxigênio singlete. Estes agregados são formados à medida que a concentração de FS é aumentada numa solução ou quando um FS que possui caráter hidrofóbico estiver presente em meio aquoso, pois a solubilizando ocorre de forma não adequada por causa da falta de afinidade do princípio ativo com a água, formando os agregados.(8) A fotodegradação do FS, que também está relacionada como problema nessa terapia, corresponde à modificação da estrutura do composto, geralmente ocasionada pelas espécies reativas tóxicas (principalmente o oxigênio singlete) produzidas durante a TFD pelo próprio FS. Esta modificação reduz a quantidade de FS intacto no meio de reação, provocando queda da ação fotodinâmica. Este evento causa perda na eficiência do processo, dificultando a destruição completa dos microrganismos.(90) Ter conhecimento sobre a formação de agregados e a fotodegradação do FS, facilita o desenvolvimento de novos composto que possam contribuir para a melhora da eficácia na IFD.

2.5 Curcumina e curcuminóides

A cúrcuma, conhecida como açafrão da terra, é uma planta de nome científico *Curcuma longa* L., pertence à família Zingiberaceae, amplamente cultivada em países asiáticos, principalmente na Índia e na China. O seu uso na medicina indiana, no tratamento de diversas doenças, tem sido muito relatado na literatura.(91–93) Pesquisas identificaram a curcumina, um dos componentes da cúrcuma, como a principal responsável pela atividade biológica desta planta.(94)

A curcumina é um pigmento natural de cor amarela e antioxidante, presente nos rizomas da cúrcuma. Apresenta-se na forma de pó e é muito utilizada como tempero, agente aromatizante, corante de tecidos e medicamento.(91,93) Pertence à classe dos polifenóis, que são substâncias que possuem hidroxilas ligadas a anéis aromáticos.(95) São extraídos três curcuminóides da planta: a curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina (Figura 2). Os curcuminóides têm sido extensivamente estudados devido à sua ampla variedade de propriedades farmacológicas.(96)

Figura 2 - Fórmula estrutural dos compostos curcuminóides presentes na cúrcuma.
Fonte: Adaptada de PERET-ALMEIDA et. al. (96)

Estudos comprovam que a curcumina possui várias propriedades biológicas, como: imunomodulatória, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antibacteriana e antifúngica.(91,92,97) A curcumina pode ser utilizada como FS na IFD como um tratamento bactericida alternativo, atuando em infecções superficiais localizadas.(98) Existem relatos do seu uso como FS na inativação de cepas metilina-resistentes de *Staphylococcus aureus* (99), na inativação de espécies do fungo *Candida* (72,80), na inativação de fungos causadores de onicomicose (100), na inativação de amebas de vida livre (101) e no estudo de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.(98)

A curcumina tem seu pico de absorção máxima no comprimento de onda 430 nm, espectro de fluorescência de excitação em 434 nm e de emissão em 520 nm. É um composto praticamente insolúvel em água, sendo mais estável em meio aquoso com pH acima do neutro (pH alcalino). Mesmo em pH alcalino, a curcumina sofre rápida degradação (96) por ser extremamente instável em ambiente líquido, seja ele água, etanol ou solvente. Por isso, o avanço clínico com formulações que envolvem curcumina tem enfrentado dificuldades, por sua baixa solubilidade em água e seu tempo de meia-vida curto, resultando em baixa biodisponibilidade.(102) Pesquisas têm sido realizadas a fim de encontrar a melhor forma de diluição da curcumina em solução aquosa com estabilidade e solubilidade aceitáveis.

Entretanto, desenvolver uma formulação otimizada, que apresente pH estável e solubilidade aceitável, tem sido um desafio, pois tal formulação deve ser estável não só durante sua produção e estocagem, mas também durante todo o processo de irradiação da IFD.(103)

2.6 Sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fotossensibilizadores

A nanotecnologia, atualmente, vem sendo aplicada em diversas áreas do conhecimento, como: fibras e têxteis, agricultura, eletrônica, ciências forenses, no espaço e na terapêutica médica.(104) A nanotecnologia farmacêutica é uma das áreas das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados com o intuito de direcionar e controlar a liberação de fármacos.(105) A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, monitoramento, diagnóstico e controle de sistemas biológicos foi denominada “Nanomedicina” pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos.(106)

Esta tecnologia teve seu início nos anos 60, com o desenvolvimento inicial de microencapsulação, que é uma técnica que transforma líquido (polímeros, por exemplo) em pó com partículas de tamanho micrométrico. A microencapsulação foi modelo para outras técnicas mais sofisticadas, que permitiram o desenvolvimento de nanopartículas (escala nanométrica). As nanopartículas são partículas poliméricas que se encontram na forma de reservatório (cápsulas) ou de matriz, nas quais o princípio ativo está encapsulado ou adsorvido na malha polimérica.(12) Na década de 90, surgiram nanossistemas mais sofisticados revestidos de polímeros hidrofílicos, chamados de sistemas furtivos, pois permitiam um tempo maior de circulação no organismo.(20) Além destes, surgiram os sistemas contendo sinalizadores na superfície da partícula denominados sítio-específicos, que foram desenvolvidos com a finalidade de direcionar o fármaco para seu local específico (sítio de ação), as células-alvo.(107)

Entre as vantagens dos nanossistemas, pode-se destacar: proteção do princípio ativo contra possíveis instabilidades encontradas no organismo, promovendo concentrações constantes em níveis plasmáticos; proteção contra a degradação precoce; aumento da eficácia terapêutica; liberação controlada e progressiva, condicionada aos estímulos do meio (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); diminuição da toxicidade por reduzir os picos plasmáticos de concentração máxima; melhora da estabilidade; possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas; diminuição da dose terapêutica e diminuição do número de administrações.(25,108-109)

Através da utilização de vetores, tornou-se possível o controle da liberação do ativo em sítios de ação. Dentre eles, estão incluídos as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). O termo nanopartícula engloba tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas, as quais se diferem pela sua composição e estrutura.(110) Entre esses sistemas nanoestruturados, estão as micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas metálicas e as nanopartículas baseadas em ácidos nucleicos.(19,111-112)

Nanopartículas poliméricas têm sido sintetizadas através de diversas metodologias, dependendo da sua aplicação e o tipo de fármaco a ser encapsulado.(18) As nanopartículas biodegradáveis são frequentemente escolhidas como vetores e utilizadas, pois melhoraram o valor terapêutico de fármacos, na maioria, insolúveis, aumentando sua biodisponibilidade, solubilidade e o tempo de retenção no organismo.(113) Além de serem capazes de fazer a entrega da droga de forma direcionada, são facilmente degradadas e eliminadas. Elas fornecem uma liberação sustentada, apresentam tamanho subcelular e são biocompatíveis com os tecidos e células.(22) Além disso, estes nanomedicamentos são normalmente mais estáveis no sangue, não tóxicos, não imunogênicos, não inflamatórios e biodegradáveis.(23) A síntese geral de encapsulamento de compostos está representada na Figura 3.

Figura 3-Tipos de nanopartículas poliméricas biodegradáveis: de acordo com a organização estrutural as mesmas são classificadas como nanocápsulas e nanoesferas. A molécula de fármaco é aprisionada no interior das nanopartículas ou adsorvida na superfície.

Fonte: Adaptada de KUMARI et al. (18).

O uso de nanocápsulas é relatado para proteção de diferentes sistemas de aplicação farmacêutica ou cosmética, especialmente para substâncias que degradam em temperaturas acima de 40 °C ou são sensíveis à oxidação em presença de água, variação de pH ou por efeito de luz.(114) Um estudo relatou que houve aumento da estabilidade frente à fotodegradação do metoxicinamato de octila promovido pelo nanoencapsulamento desta substância.(115) A membrana polimérica presente nas nanocápsulas possui efeito protetor contra possíveis danos causados por agentes externos, prevenindo uma degradação precoce.(116)

Estas nanoformulações são consideradas superiores em relação à medicina tradicional por promover liberação controlada, entrega direcionada da droga e impacto terapêutico. São capacitadas de tais características devido seu tamanho, carga de superfície, modificação da superfície e hidrofobia. Entre estes, as distribuições de tamanho e a dimensão de nanopartículas são importantes para determinar a sua interação com a membrana celular e a sua penetração através das barreiras fisiológicas. Por causa do tamanho das nanopartículas, elas conseguem atravessar barreiras biológicas diferentes no local alvo e na circulação.(21) Para a internalização celular das nanopartículas, a carga de superfície é extremamente importante, pois determina se as nanopartículas irão se agrupar no fluxo sanguíneo ou interagir com células de carga oposta. Uma carga de superfície catiônica é desejável, pois promove interação das nanopartículas com as células, aumentando a velocidade e o grau de internalização.(13)

2.7 O uso de nanopartículas na TFD

Apesar do elevado potencial dos fotossensibilizadores para aplicações na TFD, a rápida eliminação pelo organismo e baixa taxa de acumulação nos tecidos de interesse, bem como a baixa solubilidade em meio aquoso e rápida degradação físico-química, limitam a aplicação destes sistemas. Por exemplo, a agregação das moléculas de FS em meio aquoso, já que a maioria são hidrofóbicas, afeta sua fotoativação (diminuição da formação $^1\text{O}_2$). A imobilização do FS em nanopartículas (<1 μm de tamanho) é considerada uma excelente alternativa para solucionar tais dificuldades encontradas, pois geralmente, as nanopartículas são utilizadas como carregadoras de FS hidrofóbicos, melhorando a dispersão destes em sistemas aquosos.(26)

Um sistema ideal de entrega de FS deve permitir o acúmulo seletivo do mesmo no interior do tecido doente, e entregar concentrações terapêuticas para as células-alvo e quase nenhuma captação por células normais. O carregador utilizado deve ser capaz de incorporar o

FS sem que ele perca ou altere sua atividade. Esses carregadores podem ser micelas, lipossomos, nanopartículas poliméricas, nanocristais, nanotubos, nanopartículas metálicas e nanopartículas cerâmicas.(117-118) As características dos carregadores empregados irão determinar a farmacocinética, o comportamento e a interação do FS. Existem diversas técnicas diferentes para encapsulamento de composto, que serão brevemente descritas abaixo.(119)

As nanopartículas poliméricas apresentam um grande potencial como agente transportador de FS e outros fármacos, pois sua superfície pode ser modificada quimicamente, possibilitando a incorporação de agentes terapêuticos, além de serem biodegradáveis, não tóxicas e sem atividade, possibilitando a construção de um dispositivo multifuncional.(120)

2.8 Nanopartículas de Poli (ácido láctico co-glicólico) PLGA

O PLGA (poli-D, L-láctico-co-glicólico) é um dos polímeros biodegradáveis utilizados capazes de formar nanosistemas com mais sucesso para o desenvolvimento de nanomedicamentos, pois no corpo sofre hidrólise e produz biodegradáveis monômeros de ácido láctico e ácido glicólico (Figura 4).

Figura 4 - Hidrólise de nanopartículas de PLGA: nanopartículas de PLGA são biologicamente hidrolisadas em meio ácido, resultando em ácido láctico e glicólico. Estes produtos de hidrólise são metabolizados no ciclo do Krebs.

Fonte: Adaptada de KUMARI, et. al. (18)

Como o organismo tolera muito bem esses dois monômeros, quase não há toxicidade sistêmica quando ele é utilizado para aplicações de entrega de drogas ou de biomateriais. As nanopartículas de PLGA têm sido, em sua maioria, preparadas através de métodos de

emulsificação-difusão (46), emulsão-evaporação do solvente (36), deposição interfacial (42) e nanoprecipitação (Figura 5).(47)

Figura 5 - Metodologias diferentes para síntese de nanopartículas de PLGA: A maioria das nanopartículas de PLGA são sintetizadas por difusão-emulsão, evaporação de solventes e nanoprecipitação.

Fonte: Adaptada de KUMARI, et. al. (18).

Geralmente, no método emulsificação-difusão, os polímeros de PLGA são dissolvidos em solvente orgânico, como por exemplo, acetato de etila, separados e vertidos em fase aquosa que contém um estabilizador, para depois serem homogeneizados. No método de evaporação do solvente, os polímeros são dissolvidos num solvente orgânico volátil, por exemplo, a acetona, e são vertidos em agitação forte e contínua em uma fase aquosa com ou sem um estabilizador e, posteriormente, são sonicados. O método de deposição interfacial tem sido utilizado para a formação de nanocápsulas e nanoesferas. As nanopartículas são sintetizadas na camada interfacial de água e solvente orgânico (miscível com a água) e, finalmente são separadas por centrifugações.(123) O método mais comumente utilizado para a preparação de nanopartículas de PLGA é a nanoprecipitação. No polímero dissolvido em acetona (sob agitação) é adicionado, gota a gota, um fase aquosa com ou sem um estabilizador e, então, a fase orgânica é evaporada.(124)

A eficiência da modificação da superfície pode ser estimada através da medição da carga de superfície, o potencial zeta (ζ) das nanopartículas, que pode ser medido através da mobilidade das partículas carregadas por um potencial elétrico. Dependendo do polímero

utilizado e da modificação da superfície, o valor de potencial zeta pode ser positivo, neutro ou negativo.(125) O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (polydispersity index - PDI) podem ser medidos por espectroscopia de correlação de fótons (também chamado de "dispersão de luz dinâmica"). Esta técnica baseia-se na dispersão da luz causada pelo movimento Browniano das partículas.(126) Técnicas de imagem, como a microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia de força atômica, fornecem informações sobre a morfologia e tamanho das nanopartículas. A liberação e resposta das nanopartículas de PLGA carregadas com compostos hidrofóbicos são influenciadas por carga de superfície, método de preparação, tamanho de partícula e peso molecular do composto encapsulado.(18)

Já é conhecido que nanopartículas à base de PLGA apresentam muitas vantagens para a entrega de drogas, protegem medicamentos da degradação precoce e melhoraram sua estabilidade. Além disso, por causa do seu tamanho, as nanopartículas podem penetrar tecidos específicos, e isto permite uma administração específica de drogas, proteínas, peptídeos ou ácidos nucleicos para um tecido alvo. Ainda podem aumentar a eficácia de tratamentos por causa da liberação controlada do agente terapêutico a partir das nanopartículas estáveis. Outra grande vantagem do PLGA é ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em seres humanos e nanomedicamentos, o que torna mais facilmente seu uso na pesquisa para, posteriormente, aplicação na prática clínica.(127) As nanopartículas de PLGA têm sido utilizadas no desenvolvimento de proteínas e péptidos na nanomedicina, nanovacinas, nanopartículas à base de sistema de entrega de genes, fator de crescimento, insulina, fármacos ativos, fotossensibilizadores, etc.(18)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo desse estudo foi elaborar o encapsulamento da curcumina natural em nanopartículas do polímero PLGA, para torná-la solúvel em solução aquosa. Verificar sua estabilidade e sua atividade fotodinâmica em microrganismos comparando com uma solução de curcumina natural livre.

3.2 Objetivos específicos

- Síntese de nanopartículas de PLGA contendo curcumina natural através de nanoprecipitação;
- Caracterização das nanopartículas através da determinação do tamanho médio, potencial zeta, índice de polidispersão, a eficiência do encapsulamento, morfologia através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfil de liberação do composto e determinação de quantas moléculas do FS por nanopartícula sintetizada.
- Estudo e comparação da estabilidade das suspensões de PLGA-CURC (sigla dada para as nanopartículas contendo curcumina natural) e da solução aquosa de curcumina natural livre (não encapsulada);
- Avaliação e comparação da atividade fotodinâmica das PLGA-CURC e da solução aquosa de FS em inativar microrganismos, bactérias e fungo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solução de curcumina

A curcumina natural utilizada consiste em uma mistura de curcuminóides na proporção 40% curcumina e 60% demais curcuminóides (demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina). Foi fornecida pela PDTPharma Ltda. (Cravinhos-SP, Brasil), em forma de pó (avermelhado) e conservada, após aberta, em geladeira a 3°C. A dissolução do pó foi feita primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1% (m/v) para posteriormente ser dissolvida em álcool absoluto (etanol) em uma concentração final de 1,5 mg/mL. Para os ensaios realizados, essa solução alcoólica de curcumina foi diluída em água MilliQ até a concentração requerida para cada experimento.

4.2 Síntese de nanopartículas de poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA)

A síntese de nanopartículas de PLGA, com ou sem curcumina, foi realizada por meio do método conhecido como nanoprecipitação ou evaporação de solvente, introduzido por Fessi e colaboradores.(30) Neste processo, o polímero foi suspenso em um solvente orgânico miscível em água e adicionado a uma solução aquosa nas condições adequadas na presença de um estabilizante. A formação da partícula é espontânea uma vez que o polímero “precipita” no meio aquoso. Finalmente, o solvente orgânico é evaporado.

4.2.1 Reagentes e Concentrações

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos. As soluções aquosas foram preparadas com água MilliQ (18,2 MΩ.cm a 25°C).

- Poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA) 5 mg/mL em acetona. O sistema foi mantido em recipiente fechado sob agitação constante e aquecido até no máximo 40°C para a completa dispersão do polímero.

- Solução alcoólica de curcumina (1,5 mg/mL)
- Curcumina natural em pó
- Dextran: 0,8% m/v em água MilliQ.
- Poli (alilamina hidroclorada) PAH 10 mg/mL em água MilliQ.

4.2.2 Procedimento Experimental

Foram realizadas três sínteses diferentes das quais foram nominadas PLGA-CURC1, PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3:

PLGA-CURC1:

Para a síntese PLGA-CURC1, 134 μ L de solução alcoólica de curcumina natural (1,5 mg/mL) foi adicionada a 6,67 mL de suspensão de PLGA (5 mg/mL em acetona). O sistema foi mantido por uma hora sob agitação. E, então, adicionou-se 20 mL de uma suspensão aquosa de Dextran (0,8% v/v), sob forte agitação magnética. A suspensão mudou de translúcida para opaca instantaneamente, indicando a formação das nanopartículas. O sistema foi deixado por 10 minutos adicionais sob agitação forte e, então, a acetona foi evaporada por meio de um sistema a vácuo. Vale ressaltar que a adição de um segundo polímero hidrofílico à fase aquosa, no caso o Dextran, teve como função melhorar a estabilidade em meio aquoso, a monodispersividade e introduzir grupos funcionais a superfície das partículas. Finalmente, o sistema foi lavado por centrifugação (6000 x g, durante 10 min, à 4°C) para remover o excesso de curcumina natural não encapsulada.

PLGA-CURC2:

Para a síntese PLGA-CURC2, 10 mg de curcumina natural em pó foi adicionada a 3,34 mL da suspensão de PLGA (5 mg/mL em acetona). O sistema foi mantido por uma hora sob agitação e, então, adicionou-se 10 mL de uma suspensão aquosa de Dextran (0,8% v/v), com forte agitação magnética. Assim como na síntese 1, houve uma mudança nítida na consistência da suspensão, indicando formação de nanopartículas. O sistema também foi lavado por centrifugação (6000 x g, 10 min, 4°C) para remover o excesso de curcumina natural não encapsulada.

PLGA-CURC3:

O terceiro sistema consiste em uma modificação da superfície das nanopartículas PLGA-CURC2. Para isso, 5 mL de uma suspensão do polímero PAH (10 mg/mL) foi adicionada gota a gota sob agitação leve a 5 mL da suspensão de PLGA-CURC2. Esse sistema foi incubado sob agitação magnética leve em geladeira a 4°C por, pelo menos, 12 horas.

Nanopartículas na ausência do fotossensibilizador também foram sintetizadas. Neste caso, a preparação procedeu-se analogamente ao descrito para síntese 1, sendo que os 134 μ L adicionados foram de água MilliQ. Este sistema foi utilizado como controle nos testes.

4.3 Caracterização das nanopartículas

Uma série de experimentos foi realizada para caracterizar as nanopartículas de PLGA quanto a sua forma, tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, entre outros. Esses ensaios de caracterização foram necessários e importantes para posterior aplicação da TFD na microbiologia.

4.3.1 Curva de calibração

A concentração de curcumina foi determinada por meio da absorção no Ultravioleta-Visível (UV-VIS) em 430 nm e do coeficiente de absortividade molar, determinado a partir da construção de uma curva de calibração, de acordo com a Lei de Beer-Lambert. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi (High Technologies, U-2900 Spectrophotometer, Japan). A curva de calibração foi construída através de onze diluições de curcumina em etanol. As concentrações utilizadas foram de 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,2 e 0,1 µg/mL. Os resultados foram analisados por meio da construção de uma curva concentração versus absorbância em 430 nm, seguida do cálculo da equação da reta.

4.3.2 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi estipulado através do Zetasizer (Malvern espectrômetro Nano ZS – Malvern Instruments, UK) com base na dispersão de luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering* - DLS). As análises foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90° e temperatura de 20°C. Para medir o tamanho, as três suspensões de nanopartículas foram diluídas em água Milli-Q e sonicadas durante 30 segundos a temperatura ambiente. O diâmetro médio de cada sistema foi obtido a partir da média proveniente de três medidas. O índice de polidispersibilidade (*polydispersity index* - PDI) é um número que indica a faixa de distribuição de nanopartículas na formulação, que foi utilizado como parâmetro de qualidade em cada síntese. O PDI pode variar de zero a um, onde zero indica que as partículas da formulação estão completamente monodispersas. Para nanopartículas de polímeros, um PDI até 0,2 é considerado boa distribuição de tamanhos. O potencial zeta é uma medida que indica a carga (positiva ou negativa) presente na superfície das nanopartículas, que conseqüentemente está relacionada com estabilidade eletrostática da formulação em meio aquoso e sua interação com membranas celulares. O Zetasizer, também

foi utilizado para medir o potencial zeta das nanopartículas. Seu princípio consiste em aplicar uma mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. Foram feitas três leituras (cada uma resultante de trinta corridas). A amostra foi preparada semelhantemente a amostra para medida do tamanho, descrito acima.

4.3.3 Tamanho e morfologia das nanopartículas

O tamanho e a morfologia das nanopartículas foram caracterizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV): Inspect F50 (FEI, Holanda), o qual é constituído por um feixe de elétrons em lugar de fótons (utilizado em microscópio óptico convencional). Seu princípio consiste em utilizar esse feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica, cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. A principal razão de sua utilidade é devido a sua alta resolução, podendo identificar amostras que possuem valores da ordem de 2 a 5 nanômetros. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. MEV permite o exame de pequenas amostras, com grande profundidade de foco, porque a imagem eletrônica complementa a informação dada pelas imagens ópticas. As amostras de PLGA-CURC1, PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3 foram concentradas em água MilliQ para posterior análise. Para as medidas, uma lâmina de silício polido foi colada a um stub por um pedaço de fita dupla face condutora (fita carbono). Volumes de 1 a 2 μ L foram depositados sobre o silício e estas gotas foram deixadas para secar, sob um fluxo leve de ar morno (secador funcionando a 400 W). As imagens foram obtidas a partir de elétrons secundários, com um feixe de 2 kV, para evitar danos às amostras, uma vez que elas não foram recobertas. Normalmente, as amostras não condutoras são recobertas com uma camada fina de metal (ouro, platina, platina-paládio) para conduzir os elétrons do feixe principal. No entanto, para os nanomateriais este procedimento pode ser dispensado devido ao pequeno tamanho do material que facilita o não acúmulo de carga, e o recobrimento (tipicamente 5-20 nm) pode influenciar a interpretação das imagens.

4.3.4 Eficiência do encapsulamento das nanopartículas

A quantidade de curcumina natural encapsulada nas nanopartículas de PLGA foi estimada por espectroscopia no UV-VIS. Para isso, após a centrifugação dos sistemas como

descrito anteriormente ($6000 \times g$, 10 minutos $4^{\circ}C$) para remover o excesso do princípio ativo e polímeros, o espectro de absorbância no UV-VIS de cada sobrenadante foi medido. O comprimento de onda observado foi o máximo da curcumina (430 nm) para identificar a concentração de curcumina (primeira lavagem), que representa a porcentagem não encapsulada. Em seguida, todo o processo foi repetido, e o segundo sobrenadante de cada amostra foi lido novamente (segunda lavagem). Após a segunda centrifugação, foi adicionada água MilliQ aos peletes de nanopartículas e, em seguida, as amostras foram sonicadas em ultrassom de banho para ressuspender as nanopartículas. A porcentagem da eficiência de encapsulamento foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ encapsulada} = \frac{[\text{total de curcuminóides} - \text{curcuminóides não encapsulados}]}{\text{total de curcuminóides}} \times 100 \quad (1)$$

Para confirmar o valor encapsulado, em um pelet foi adicionado etanol e foi deixado sonicando durante 30 minutos a $40^{\circ}C$, para que as nanopartículas fossem estouradas e liberassem o conteúdo total de curcuminóides do seu interior. Após esse tratamento, o espectro de absorbância de cada uma das 3 amostras foi lido em UV-Vis. O espectro das amostras tem que condizer com o cálculo feito com os espectros de lavagem.

4.3.5 Liberação dos curcuminóides das nanopartículas de PLGA

Para que os curcuminóides fossem liberados das nanopartículas de PLGA foi realizado um teste de liberação através de uma membrana de diálise (tamanho molecular de 12 kDa). Uma solução concentrada de PLGA-CURC1 (equivalente a 0,2 mg/mL de mistura de curcuminóides) e de PLGA-CURC2 (equivalente a 0,8 mg/mL) foram transferidas para o interior de 2 sacos de membranas de diálise diferentes (Sigma-Aldrich, EUA). As membranas foram colocadas cada uma em uma solução de 50% de água MilliQ e 50% de etanol absoluto a $37^{\circ}C$ sob agitação leve constante de 100 rpm (agitador magnético). Em intervalos de tempo já predeterminados, um volume de 1 mL de cada suspensão foi recolhido e substituído pela mesma solução. A amostra, contendo os curcuminóides já liberados no meio, teve seu espectro de absorbância medido em UV-Vis na região de 420 nm. Todos os resultados foram guardados para posterior montagem do gráfico de liberação do FS.

4.4 Estabilidade das nanopartículas

4.4.1 Degradação com luz azul (450 nm)

A fim de verificar se o encapsulamento no polímero PLGA exerceria proteção contra a degradação causada pela luz na curcumina natural, os três sistemas e a solução aquosa de curcumina natural foram degradadas com luz azul (450 nm comprimento de onda da curcumina). Ambas as amostras foram concentradas em cubetas de plástico vedadas (1 cm^3), iluminadas com o equipamento biotable e, em seguida, medidas em UV-Vis. As absorbâncias foram lidas nos tempos: 0 (sem luz), 10 e 20 minutos de iluminação, que são os tempos utilizados na inativação fotodinâmica dos microrganismos, referentes às doses de iluminação de 21 e 42 J/cm^2 , respectivamente. Para construção de uma curva mais precisa, mais pontos foram adicionados, e as amostras foram lidas de 2 em 2 minutos iluminados, resultando em um gráfico de onze pontos. Os espectros de absorbância foram substituídos na equação da reta para determinação da concentração de curcuminóides que havia na amostra em cada tempo de iluminação.

4.4.2 Degradação com diferentes concentrações de O_2

O oxigênio molecular é um dos principais componentes da terapia fotodinâmica, para que ocorra a degradação, junto com a luz, do fotossensibilizador. Nesse teste, apenas a solução de curcuminóides livre diluída em água MilliQ foi testada, a fim de averiguar o comportamento dos curcuminóides frente a diferentes concentrações de oxigênio. Foram testadas três concentrações de oxigênio, com o intuito avaliar se ele seria um componente importante para degradação precoce do fotossensibilizador, com saturação de oxigênio (20 mg/mL), sem alterar a concentração da solução (6 mg/mL) e com baixa concentração de oxigênio (0,6 mg/mL). Todas as amostras foram feitas e mantidas em cubetas de plástico completamente vedadas para que não houvesse troca de oxigênio com o ambiente. Para saturar a amostra foi borbulhado o gás oxigênio e para diminuir a concentração de oxigênio foi borbulhado o gás argônio, que fez a retirada quase completa do oxigênio da amostra. Todas as amostras tiveram suas concentrações medidas no oxímetro. As amostras foram lidas em UV-Vis, no tempo zero até o tempo de 20 minutos de iluminação. A curva de degradação foi feita a partir dos onze pontos de absorbância coletados.

4.4.3 Degradação com diferentes tempos e temperatura

A estabilidade dos sistemas com relação ao tempo e temperatura também foi avaliada. A primeira condição testada foi manter a solução de FS livre e encapsulada nas nanopartículas em geladeira a 4°C, e a segunda, em estufa a 37°C. O espectro de absorbância foi medido em álcool absoluto de tempos em tempos durante dois meses de estocagem. As nanopartículas foram colocadas em solução alcoólica e deixadas em sonificador durante 30 minutos a 40°C, para que fossem estouradas e liberassem o conteúdo de curcumina natural no seu interior antes de serem medidas. A partir dos valores das absorbâncias, foram construídos dois gráficos de degradação pelo tempo (um em geladeira e outro em estufa). Vale ressaltar que em ambas condições testadas as amostras foram mantidas protegidas da luz.

4.5 Fonte de luz

A fonte de luz empregada para a iluminação das amostras tanto na caracterização (degradação com fonte luminosa) quanto para os testes com microrganismos foi um equipamento constituído de LEDs (light emitting diodes), desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP), intitulado Biotable, constituído de 24 pontos de LEDs azul (450 nm). Esse equipamento foi projetado para que houvesse uma irradiação uniforme em uma placa multipoços contendo 24 poços. A Biotable possui intensidade de saída constante, no caso da luz azul, a intensidade é de 35 mW/cm². A luz emitida se encontra numa estreita faixa do espectro eletromagnético, na qual o FS empregado apresenta alta capacidade de absorção de luz. Por isso, de acordo com os espectros de absorção do fotossensibilizador, é escolhido um equipamento que cubra a essa faixa de luz absorvida. No caso da curcumina natural, o equipamento com luz no comprimento de onda de 450 nm (faixa de absorção de energia) foi escolhido.

4.6 Microrganismos

Os testes *in vitro* foram realizados nos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bactéria Gram-positiva, *Escherichia coli* (ATCC 25922), bactéria Gram-negativa e *Candida albicans* (ATCC 90028), fungo filamentoso. As cepas das bactérias foram mantidas em congelador a -4°C, em meio líquido *Trypticase Soy Broth* - TSB (Acumedia® –

Neogen® Corporation - Brazil). O fungo foi mantido em ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia® – Neogen® Corporation - Brazil) incubado em estufa a 37°C por 7 dias.

4.7 Inativação fotodinâmica dos microrganismos

4.7.1 Preparo das bactérias para os ensaios *in vitro*

Para a realização dos experimentos com bactérias, o mesmo protocolo foi utilizado tanto para Gram-positiva quanto para Gram-negativa. Um volume de 1 mL de bactéria (mantida em congelador) foi transferido para tubo falcon esterelizado contendo meio TSB autoclavado e em seguida homogeneizado em agitador automático de tubos vigorosamente por 20 segundos. O tubo foi mantido sob agitação *overnight* em *shaker* com temperatura controlada de 37°C. No dia seguinte, o tubo contendo o inóculo de bactéria foi lavado 2 vezes com solução tampão fosfato-salino PBS (phosphate buffered saline) autoclavada (por centrifugação, 15 minutos à 3000 rpm para cada lavagem), para que todo o meio líquido TSB fosse retirado. Após esse procedimento, foram feitas diluições para chegar na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônias).

4.7.2 Preparo do fungo para os ensaios *in vitro*

Para a realização dos experimentos com *Candida albicans*, uma colônia de fungo foi transferida para uma placa Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose autoclavado, que foi deixada em estufa a 37°C por 24 horas (para crescimento). No dia seguinte, todo conteúdo da placa foi colocado em tubo *falcon* esterelizado contendo PBS autoclavado e em seguida homogeneizado em agitador automático de tubos vigorosamente por 20 segundos. O tubo contendo o inóculo do fungo foi lavado 2 vezes com PBS autoclavado (por centrifugação, 10 minutos à 3000 rpm para cada lavagem), para que todo o meio ágar fosse retirado. Após esse procedimento, foram feitas diluições e a densidade da suspensão foi analisada em espectrofotômetro (Cary 50bioVarian®) até chegar a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

4.7.3 Condições experimentais avaliadas com as nanopartículas e solução livre de curcumina natural

Para inativação fotodinâmica dos microrganismos escolhidos, foram utilizadas as três sínteses de nanopartículas (PLGA-CURC1, PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3) e sempre que uma suspensão era testada em experimento, a solução livre de curcuminóides também era, juntamente, para posterior comparação das duas formulações. Cada síntese foi avaliada separadamente com cada microrganismo (bactérias e fungo), em condições variadas.

Para as nanopartículas PLGA-CURC1, primeiras a serem testadas, foi colocada uma concentração inicial de 1 µg/mL e dois tempos diferentes de incubação (1 e 5 horas) o que resultou em duas concentrações (0,1 e 1 µg/mL, referentes ao gráfico de liberação da curcumina natural das PLGA-CURC1). Essas foram estipuladas conforme a curva de liberação dos curcuminóides das nanopartículas para que houvesse uma concentração semelhante de FS livre no experimento referente. O tempo de iluminação foi de 10 e 20 minutos resultando em doses de luz de 21 e 42 J/cm², respectivamente. Esta suspensão foi testada em todos os microrganismos utilizados nesse trabalho. Com os resultados das triplicatas desse primeiro teste, foram programados os seguintes, com as PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3.

Para as PLGA-CURC2, foram testados dois tempos de incubação (1 e 5 horas) com duas diferentes concentrações iniciais: 7 µg/mL e 500 µg/mL. Essa condição foi avaliada na bactéria Gram-positiva e no fungo para as duas formulações de FS. A dose energética se manteve a mesma do experimento anterior.

Para as PLGA-CURC3, a condição foi semelhante à da utilizada com as PLGA-CURC2 (duas concentrações e dois tempos de incubação), porém como o sistema PLGA-CURC3 foi preparado especificamente para testar em Gram-negativa, o único microrganismo utilizado foi a *E. coli*.

Todos os experimentos seguiram o mesmo protocolo. Alíquotas de 500 µL das suspensões celulares do microrganismo foram pipetadas individualmente em oito poços de uma placa multipoços. A seguir foram analisados dois grupos experimentais: um grupo com tratamento com a curcumina natural encapsulada em nanopartículas (PLGA-CURC1, PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3) e um grupo com tratamento com a curcumina natural em solução aquosa. Cada grupo possuiu quatro condições: sem FS (encapsulado ou não encapsulado) e luz (L) (FS-L-); com FS e sem luz (FS+ L-); sem FS e com luz (FS- L+) e com FS e com luz (FS+L+, sendo esse o grupo da inativação fotodinâmica). Todas essas condições foram testadas a fim de verificar se o FS estaria atuando na inativação fotodinâmica do microrganismo. Antes dos procedimentos, todas as placas foram deixadas em repouso dentro da estufa com temperatura controlada de 37°C no escuro (tempos de incubação).

4.7.4 Análise da eficácia dos testes *in vitro* em cada condição experimental

Para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 a partir das amostras contidas nos orifícios das placas. Para isso, uma alíquota de 100 μL de cada amostra foi transferida para um *eppendorf* contendo 900 μL de PBS autoclavado. O *eppendorf* foi agitado vigorosamente em agitador e uma nova alíquota de 100 μL foi removida do mesmo e colocada em outro igual contendo 900 μL de PBS autoclavado. Esse procedimento foi realizado 5 vezes para cada amostra, resultando em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} , sendo que a amostra contida no poço da placa multipoços também foi plaqueada (10^0). Foram utilizadas as diluições (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose para o fungo, e meio *Brain-Heart Infuion* - BHI para as bactérias. Para plaquear os microrganismos, uma alíquota de 25 μL de cada diluição foi pipetada em triplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de 3 placas de Petri contendo o meio de cultura. Ponteiras de 100 μL estéreis foram utilizadas para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas em dias diferentes com inóculos de microrganismos diferentes. Após 24 horas de incubação a 37°C em estufa, as placas de Petri referentes às amostras avaliadas foram submetidas à contagem de colônias. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias (UFC) foram calculados.

Figura 6 - Esquema da diluição seriada feitas com a solução de microrganismo e seu plaqueamento em placas Petri.

Fonte: Adaptada de SILVA et. al. (100)

4.7.5 Procedimento para análise da eficácia dos testes *in vitro* em cada condição experimental variando as condições experimentais

Os parâmetros avaliados nos ensaios *in vitro* foram comparativos entre 4 formulações diferentes do mesmo fotossensibilizador: PLGA-CURC1, PLGA-CURC 2, PLGA-CURC3 e curcumina natural em solução aquosa livre, onde foram analisados diferentes doses de energia, concentrações de fotossensibilizadores e tempos de incubação representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados da inativação fotodinâmica *in vitro* dos microrganismos.

Formulação	Tempo de incubação (horas)	Concentração do FS (µg/mL)	Dose energética (J/cm ²)	Tempo de iluminação (minutos)
PLGA-CURC1	1	0,10	21	10
	2	0,34		
	3	0,49	42	20
	4	0,70		
	5	1		
PLGA-CURC2	1	7 e 500	21	10
	5	7 e 500	42	20
PLGA-CURC3	1	7 e 500	21	10
	5	7 e 500	42	20
Curcumina natural em solução aquosa	1	0,10	21	10
	2	0,34		
	3	0,49	42	20
	4	0,70		
	5	1		

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.6 Avaliação do crescimento *in vitro* sem luz e sem fotossensibilizador (L-FS-)

A condição experimental sem luz e sem formulação (L-FS-, onde L é luz e FS é fotossensibilizador) foi realizada como controle do crescimento do microrganismo não submetido aos procedimentos da inativação fotodinâmica ou outro tratamento. Foram incluídas amostras de microrganismos (10^6 células/mL no experimento com fungo, e 10^8 células/mL no experimento com bactérias). A alíquota de 500 µL de FS foi substituída pelo mesmo volume de PBS autoclavado para cada poço, e foram mantidos durante os mesmos tempos de incubação no escuro e, em seguida, plaqueados. Os resultados obtidos nesse grupo

(L-FS-) foram utilizados como parâmetros para comparação com aqueles obtidos com as amostras submetidas à fotossensibilização (citotoxicidade no escuro), à iluminação com o LED e a inativação fotodinâmica.

4.7.7 Avaliação do crescimento *in vitro* sem luz e com fotossensibilizador (L-FS+)

Esse ensaio foi realizado para avaliar a toxicidade do fotossensibilizador no escuro, a fim de verificar se o mesmo exibe algum efeito tóxico sobre o crescimento *in vitro* dos microrganismos. Adicionou-se 500 µL do FS livre e do encapsulado (poços diferentes), em variadas concentrações (ver Tabela 1), com a mesma concentração celular descrita anteriormente. Nesta condição avaliada, as culturas continham o FS (encapsulado e livre), porém, não foram iluminadas (L-FS+). Após os tempos de incubação, e da irradiação de luz, os microrganismos foram plaqueados.

4.7.8 Avaliação do crescimento *in vitro* com luz e sem fotossensibilizador (L+FS-)

Este experimento teve como objetivo avaliar se a aplicação da luz, na ausência do fotossensibilizador, poderia apresentar efeitos tóxicos ou estimuladores para os microrganismos. Para cada teste, alíquotas de 500 µL da suspensão de celular, com o mesmo volume em PBS, foram submetidas aos tempos de incubação (prévio à irradiação) e então foram irradiadas utilizando a Biotable (Figura 5). O equipamento foi acionado e todos os poços da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente. A intensidade de irradiação de cada LED foi de 35 mW/cm² no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram comparados com os grupos controle.

4.7.9 Avaliação do crescimento *in vitro* com luz e com fotossensibilizador (L+FS+)

A fim de verificar a ação fotodinâmica sobre as colônias de microrganismos, avaliou-se as amostras celulares de patógenos com a mesma quantidade de FS (livre e encapsulado). Após a incubação no escuro, iniciou-se a irradiação. As concentrações avaliadas foram desde 0,1 à 500 µg/mL, tanto de FS livre quanto das síntese de PLGA com curcuminóides. Irradiação com intensidade de 35 mW/cm² e nas fluências de 21 e 42 J/cm², para o comprimento de onda de 450 nm.

4.7.10 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)

Para cada condição avaliada, foram realizadas três repetições em dias diferentes. A contagem foi realizada nos quadrantes referentes às diluições que apresentaram crescimento acima de sete colônias. Após a contagem, foi obtida a média entre as triplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). O cálculo das UFC/mL foi realizado através da equação:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colônias} \times \text{número de diluições}}{\text{Volume (mL)}} \quad (2)$$

Como os valores de UFC/mL são elevados, estes foram transformados em logaritmo na base 10. Com o objetivo principal de verificar a eficácia dos tratamentos com duas formulações diferentes na redução da viabilidade de três microrganismos, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, a análise inferencial utilizada possibilitou a comparação entre esses dois grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sínteses, caracterização e estabilidade das nanopartículas

5.1.1 Sínteses das nanopartículas

A curcumina tem sido associada como antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa, anticancer e antimicrobiana.(24) Apesar de todas as propriedades farmacológicas, a curcumina possui baixa solubilidade em água (praticamente insolúvel), o que limita seu desenvolvimento como um agente terapêutico. Além disso, sofre rápida degradação em pH fisiológico (128), o que resulta em baixa biodisponibilidade sistêmica dificultando sua eficiência *in vivo* (129), e também quando é estocada em meio líquido aquoso (130). A curcumina natural (fornecida pela PDTPharma) não solubiliza em meio aquoso, por isso é necessário fazer uma dissolução primária em etanol e DMSO. Depois de estar em solução alcoólica, é possível solubilizar o FS em água, porém quando a concentração de curcumina é muito alta, é possível observar a formação de precipitados no fundo do recipiente, sinalizando agregados e insolubilidade. Por isso, para obtenção de um produto mais estável, solúvel e que não degrade tão rapidamente e perca sua atividade é necessário contornar essas limitações.

Neste contexto, foram desenvolvidas três suspensões de nanopartículas biodegradáveis contendo curcumina natural baseada na técnica nanoprecipitação, usando PLGA e Dextran, caracterizando-as quanto aos seus tamanhos, carga superficial, perfil de liberação; testando suas estabilidades perante quatro variáveis (luz, oxigênio, temperatura e tempo) e verificando suas atividades fotodinâmicas, comparando com a solução de curcumina natural livre.

O método de nanoprecipitação tem sido muito utilizado para encapsular uma variedade de fármacos hidrófobos.(24) A seleção de um método eficaz de preparação de nanopartículas envolve a escolha da composição do polímero, do estabilizador, do solvente, a solubilidade do fármaco e da técnica.(110) Para o encapsulamento eficiente da curcumina natural, o polímero poli (ácido láctico-co-glicólico), PLGA, foi utilizado com base na sua solubilidade no estado sólido e compatibilidade. As nanopartículas de PLGA carregadas com curcumina natural foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação (descrita por Fessi e colaboradores(30)), utilizando o polímero Dextran como estabilizador na fase aquosa.

A síntese 1, denominada PLGA-CURC1, foi realizada com uma solução alcoólica de curcumina natural (com 0,1% de DMSO) na concentração de 1,5 mg/mL juntamente com a

solução de PLGA em acetona. Nessa suspensão de partícula foi calculada uma concentração de curcumina de concentração de 10 µg/mL. Na síntese 2, denominada PLGA-CURC2, feita para uma concentração de 1 mg/mL, foi utilizado a curcumina natural em pó que foi dissolvida na solução de acetona que já continha o PLGA dissolvido. A curcumina natural solubilizou completamente nessa solução, não resultando em nenhum agregado de FS. Para a síntese 3, denominada PLGA-CURC3, foi adicionado à suspensão PLGA-CURC2, uma camada polimérica adicional, o polímero PAH. Esse procedimento foi realizado visando a modificação da carga de superfície das nanopartículas.

O polímero PLGA e a curcumina natural em pó foram dissolvidos em acetona por 1 hora (a curcumina em solução alcoólica e DMSO já estava dissolvida, mas também foi colocada durante o mesmo intervalo), e como fase aquosa contendo um estabilizador, foi colocado o Dextran (80% em água MilliQ) de uma só vez, para que houvesse a precipitação imediata das nanopartículas, pois é no choque entre as duas fases (aquosa e oleosa) que são formadas as partículas (Figura 7). Diferentemente da curcumina natural, os três sistemas de PLGA-curcumina mostraram-se solúveis em solução aquosa (soluções homogêneas), sem formação de precipitado ou agregados, e, uma vez sintetizadas, permaneceram solúveis mesmo após meses de estocagem em geladeira. Por serem pesadas, houve acúmulo de nanopartículas no fundo do recipiente, devido à estocagem, mas a solubilidade não foi alterada. Supõe-se que a estabilidade das formulações de NPs foi conseguida através das cadeias do polímero de Dextran ligados livremente em meio aquoso.

Figura 7 -Nanopartículas PLGA-CURC1 em água MilliQ (1 mg/mL).
Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de diferentes concentrações de curcumina natural, a solubilidade foi mantida, mesmo em menor ou maior concentração. Na PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3 não foi necessário o uso de álcool absoluto (etanol) e DMSO (que é extremamente tóxico e carcinogênico em certas concentrações). Assim, no final da síntese foi possível manter o FS

solúvel em água com completa retirada dos solventes, uma vez que os solventes presentes nas PLGA-CURC1 (acetona, etanol e DMSO) e nas duas demais (apenas acetona) foram evaporados em atmosfera a vácuo. Após a síntese e total evaporação dos solventes, as nanopartículas foram lavadas duas vezes em centrífuga para completa retirada da curcumina natural e PLGA que não foram encapsulados, separando apenas as partículas encapsuladas.

A liofilização é uma abordagem promissora para manter estabilidade de nanopartículas de PLGA.(131) O processo de liofilização das nanopartículas serve como estabilizador, pois a suspensão é secada e congelada, tornando-se um pó mais estável.(132) A maioria das sínteses de nanopartículas poliméricas são liofilizadas no final do processo, como forma de melhorar a estocagem e a estabilidade do composto encapsulado. As nanopartículas PLGA-CURC2 e PLGA-CURC3 foram liofilizadas e mantiveram-se estáveis por meses em congelador. Mesmo após a liofilização, as duas formulações mantiveram-se solúveis em água. Essas duas também foram testadas na microbiologia após o processo de liofilização, a fim de verificar se a inativação fotodinâmica seria afetada e se a atividade da curcumina natural se manteria mesmo após mais um processo físico.

5.1.2 Caracterização das nanopartículas

Todas as suspensões de nanopartículas foram preparadas utilizando PLGA de peso molecular 50-75 kDa (Sigma-Aldrich) em uma proporção de 75/25 em relação ao polímero solúvel em água Dextran. O tamanho médio das partículas resultantes das medidas feitas pela dinâmica de espalhamento de luz (DLS) foram de 240 nm com uma dispersão de 80 nm para a síntese 1, de 350 nm com uma dispersão de 130 nm para a síntese 2, e de 640 nm para a síntese 3 com uma dispersão de 60 nm. Todas apresentaram PDI igual ou menor que 0,2, indicando distribuição homogênea dos tamanhos das nanopartículas e suspensões estáveis.(133) A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é utilizada para medir o tamanho médio hidrodinâmico de partículas suspensas em água. Os valores resultantes são considerados diâmetros hidrodinâmicos, pois o cálculo da distribuição está de acordo com o volume hidrodinâmico deslocado pelas nanopartículas. Apesar de não serem valores exatos, é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de tamanhos de nanopartículas em função de sua praticidade, facilidade de operação e velocidade na aquisição dos dados.(134)

Os valores de potencial zeta das sínteses 1 e 2 foram negativos (abaixo de -10 mV), indicando carga superficial bem negativa e elevada estabilidade eletrostática. Na síntese 3, uma modificação superficial utilizando o polímero catiônico PAH foi realizada, resultando em

potencial zeta positivo (acima de + 10 mV). A mudança de carga foi realizada com o propósito de atingir bactérias Gram-negativas, isto porque a inativação fotodinâmica desse grupo de bactérias é um desafio devido sua composição celular, pois apresentam uma camada a mais de proteção, tornando mais difícil a entrada de compostos para o citoplasma da célula bacteriana. Alguns trabalhos reportam que FS catiônicos possuem efetividade na inativação de *E. coli*.(135,136) Quando o mesmo FS foi utilizado no microrganismo só que com carga neutra, a atividade antimicrobiana não foi efetiva. A eficiência de encapsulamento foi relativamente elevada em todas as sínteses, sendo 70% para a primeira, e 85% para as demais. Como foram sínteses diferentes, as concentrações de curcumina natural contidas nas nanopartículas após as lavagens também foram distintas. As características das nanopartículas, tais como tamanho, potencial zeta, PDI e eficiência de encapsulamento estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 - Tamanho médio das partículas (DLS), potencial zeta, PDI e eficiência de encapsulamento das três sínteses de nanopartículas.

Nanopartículas	Tamanho médio (nm)	Índice de polidispersidade	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)
PLGA-CURC1	240 ± 80	0,17	-(30 ± 8)	70 ± 3,8
PLGA-CURC2	350 ± 130	0,18	-(32 ± 5)	80 ± 4,5
PLGA-CURC3	640 ± 60	0,20	+(20 ± 4)	80 ± 4,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma alta eficiência de encapsulamento é vantajosa, já que transporta droga suficiente para o local alvo e aumenta o tempo de residência da droga. Essa elevada eficiência de encapsulamento do PLGA pode ser atribuída a diversos fatores. Primeiro, a natureza hidrofóbica das moléculas de PLGA torna relativamente fácil prender a curcumina hidrofóbica em PLGA-CURC. Segundo, a natureza hidrofóbica da curcumina resulta em perda mínima de droga para a fase externa aquosa durante o processo de formulação.(132)

Como o método com base no DLS relata apenas a distribuição dos tamanhos das nanopartículas em suspensões aquosas (diâmetro hidrodinâmico), foram feitas também imagens das três formulações em microscopia eletrônica de varredura (MEV), para melhor caracterização do diâmetro e da morfologia das nanopartículas (Figura 8). O diâmetro médio das partículas foi calculado por meio da contagem de pelo menos 100 partículas utilizando-se o programa ImageJ. A partir desses valores foram feitos histogramas com a distribuição dos

tamanhos encontrados. A primeira síntese teve um valor médio de 172 nm com uma dispersão de 50 nm, já na segunda síntese, foi encontrado um valor um pouco maior de 215 nm com uma dispersão de 78 nm, por último, na terceira síntese, foi encontrado o maior valor médio de tamanho das partículas de 242 nm com uma dispersão de 88 nm. Valores maiores eram esperados nessa última formulação, uma vez que há uma camada adicional de polímero. É possível observar ainda que o tamanho médio calculado através das imagens da MEV foi menor em relação ao tamanho determinado pelo DLS, isto porque as nanopartículas nas imagens no MEV estão na forma seca, por isso o tamanho é mais próximo do real.(29)

A curcumina natural em solução alcoólica precipita imediatamente em meio aquoso devido à baixa solubilidade (em altas concentrações) e possui características de degradação rápida.(130) Encapsulado, o composto mostrou melhora nas características de solubilidade aquosa, assim como em outras formulações já relatadas que utilizaram curcumina e PLGA, porém com outros estabilizadores, tiveram sua solubilidade e estabilidade melhorada após o encapsulamento em nanopartículas poliméricas.(29)

Figura 8 - A) Imagem das PLGA-CURC1 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). (B) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC1. (C) Imagem das PLGA-CURC2 em microscopia eletrônica de varredura. (D) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC2. (E) Imagem das PLGA-CURC3 em microscopia eletrônica de varredura. (F) Histograma feito a partir dos valores calculados na imagem da síntese PLGA-CURC3.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os testes de liberação da curcumina natural das formulações PLGA-CURC1 e PLHA-CURC2 foram investigadas utilizando uma membrana de diálise (12 kDa) em meio contendo

50% água MilliQ e 50% etanol à 37°C. A liberação foi determinada em intervalos pré-determinados durante 7 dias. A curva de liberação das formulações PLGA-CURC1 e PLGA-CURC2 são mostradas nas Figuras 9 e 10. Esse processo de liberação a partir das nanopartículas de PLGA é um processo complexo atribuído à difusão seguida por degradação, pelo peso molecular do PLGA, pela estabilidade da camada e pelas propriedades físico-químicas da droga encapsulada.(29) A liberação inicial de curcumina natural é considerada uma liberação brusca de moléculas que podem estar depositadas ou fracamente ligadas à superfície das nanopartículas, por isso é mais acentuada na curva.(137)

Figura 9 - Curva de liberação da curcumina natural da síntese 1, PLGA-CURC1.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - Curva de liberação da síntese 2, PLGA-CURC2.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para encontrar as taxas de liberação, quanto à velocidade de concentração de FS que foi liberada conforme o tempo, um modelo cinético, com uma equação, foi utilizado: após incorporação do FS nas nanopartículas, e sua colocação em meio líquido (50% água MilliQ e 50% etanol), ocorre o início de uma troca de moléculas que contém dois mecanismos básicos. Em primeiro lugar, há uma taxa de liberação para o meio livre de FS, dependendo do conjunto meio-membrana, este termo é praticamente uma constante. Por outro lado, à medida que aumenta a concentração de curcumina natural no meio de liberação, a taxa de reposição de moléculas para dentro da membrana de diálise que contém as nanopartículas vai aumentando, representando um termo de perda na concentração do meio.

Figura 11 - Esquema da cinética de liberação e reposição de moléculas de curcumina natural encapsuladas nas nanopartículas com o meio líquido.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 11 é apresentado um esquema dessa situação. Onde N_0 é concentração inicial de FS nas partículas, N é a concentração da fase estacionária, quando o sistema entra em equilíbrio. A cinética de liberação então pode obedecer à seguinte equação:

$$\frac{dN(t)}{dt} = A - \frac{N}{\tau} \quad (3)$$

Onde $N(t)$ é o número de moléculas no meio, A , a taxa de liberação de FS para o meio e τ a constante de degradação. Esta equação tem o seguinte comportamento: no início ($N=0$), há velocidade constante de acúmulo de FS no meio, que pode ser obtida pela derivada da curva de liberação (com $t \rightarrow 0$). Quando N começa a crescer, o termo de reposição $\frac{N}{\tau}$ aparece. Quando esse termo de reposição se iguala ao termo de liberação, atingem-se $\frac{dN(t)}{dt} = 0$. A partir desse momento, é cessado o acúmulo de FS no meio externo, pois a concentração que sai para o meio é igual à concentração que retorna para dentro da membrana onde estão as nanopartículas. O valor de N neste estágio estacionário é:

$$A = \frac{Nst}{\tau} = \tau \cdot A = Nst \quad (4)$$

Onde N_{st} é o valor de N no momento de equilíbrio da reação. A solução da equação dada por:

$$\frac{dN}{d\tau A - N} = -\frac{dt}{\tau}$$

$$\int_0^{N(t)} \frac{dN}{\tau A - N} = \int_0^t -dt/\tau$$

$$\int_{\tau A}^{\tau A - N(t)} \frac{dx}{x} = -t/\tau$$

$$\ln \tau A - \frac{N(t)}{\tau A} = -\frac{t}{\tau}$$

$$N(t) = \tau A (1 - e^{-t/\tau}) \text{ ou } N(t) = N_{st} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (5)$$

Por meio do ajuste da curva de liberação foi possível determinar N_{st} e τ para a condição avaliada. Os valores são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 -Valores das variáveis N_{st} , τ e A (taxa de liberação).

Síntese	N_{st} ($\mu\text{g/mL}$)	τ (min.)	A ($\mu\text{g/mL}$ por minuto)
PLGA-CURC1	2,55	492,33	$5,18 \times 10^{-3}$
PLGA-CURC2	6,86	246,16	0,03

Fonte: Elaborada pela autora.

Com os valores de N_{st} e τ substituídos na equação (4), foi possível calcular a taxa de liberação (velocidade de liberação) de curcumina natural encapsulada nas PLGA NPs no meio água e etanol. Para a PLGA-CURC1, foi encontrado uma taxa de $5,18 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ de curcumina por minuto. Para a síntese 2, PLGA-CURC2, foi encontrado uma taxa de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina por minuto. Essa taxa de liberação mais rápida observada em PLGA-CURC2 pode ser explicada pelo fato da concentração de curcumina natural nesta suspensão

ser maior do que em PLGA- CURC1, e por isso, podem ter ocorrido fracas ligações das moléculas do composto na superfície das nanopartículas, por causada alta concentração de FS. O estudo da liberação da curcumina natural das nanopartículas de PLGA é extremamente importante para concepção do sistema de entrega, pois a formulação pode, às vezes, restringir a saída do FS do material de formulação, podendo reduzir sua biodisponibilidade e eficácia.(138) Este comportamento bifásico de liberação (com alta liberação inicial, seguido de uma liberação constante) da curcumina a partir de nanopartículas de PLGA é consistente com resultados de pesquisas anteriores.(24,129,139)

Foi quantificado o número de moléculas de curcumina natural que havia em cada nanopartícula sintetizada. Para essa quantificação foi necessário conhecer o número absoluto de partículas por unidade de volume da suspensão, N. Este pode ser calculado a partir da concentração de polímero, C (g/cm³), do diâmetro da partícula, d (cm) e da densidade da partícula, ρ (g/cm³), de acordo com a relação (149):

$$N = \frac{6 \times C}{\pi \times d^3 \times \rho} \quad (6)$$

A densidade do PLGA foi estimada por Vauthier et al. (149) no valor de 1,27 g/cm³ a 20 °C.

- C = 0,0007 g/cm
- d = 175 nm = 1,75x10⁻⁵ cm

Substituindo os valores:

$$N = \frac{6 \times 0,0007}{\pi \times (1,75 \times 10^{-5})^3 \times 1,27}$$

$$N \sim 1,9 \times 10^{11} \text{ partículas de PLGA/mL}$$

Para calcular o número de moléculas de curcumina da síntese 1:

- Concentração de curcumina PLGA-CURC1= 8 µg/mL = 0,008 mg/mL
- Número de Avogadro = 6,023 x 10²³ moléculas/mol
- Massa Molar da mistura curcumina = 341,35 g/mol

$$N_{curc} = \frac{C_{curc} \times N_{avogadro}}{Massa\ Molar} \quad (7)$$

$$N_{curc} = \frac{(0,8 \times 10^{-5}) \times 6,023 \times 10^{23}}{341,35}$$

$N_{curc} \sim 1,4 \times 10^{16}$ moléculas de curcumina/mL

Fazendo a razão entre os dois N, temos quantas moléculas de curcumina por nanopartícula:

$$N_{total} = \frac{N_{curc}}{N}$$

$$N_{total} = \frac{1,4 \times 10^{16}}{1,9 \times 10^{11}}$$

$N_{total} = 7,3 \times 10^4$ moléculas de curcumina/nanopartícula de PLGA

Para calcular o número de moléculas de curcumina da síntese 2:

- Concentração de curcumina PLGA-CURC2= 0,8 mg/mL
- Número de Avogadro = $6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol
- Massa Molar da mistura curcumina = 341,35 g/mol

$$N_{curc} = \frac{(0,8 \times 10^{-3}) \times 6,023 \times 10^{23}}{341,35}$$

$N_{curc} \sim 1,4 \times 10^{18}$ moléculas de curcumina/mL

Fazendo a razão entre os dois N, temos quantas moléculas de curcumina por nanopartícula:

$$N_{total} = \frac{N_{curc}}{N}$$

$$N_{total} = \frac{1,4 \times 10^{16}}{1,9 \times 10^{11}}$$

$N_{total} = 7,3 \times 10^6$ moléculas de curcumina/nanopartícula de PLGA

5.1.3 Estabilidade das formulações e solução livre de curcumina natural

A fim de verificar a estabilidade tanto das formulações nanoparticuladas quanto da solução aquosa de curcumina natural livre (sem nanopartículas), foram feitos diversos testes que também tiveram como objetivo verificar o quanto uma formulação seria melhor ou pior que a outra, já que um dos propósitos desse trabalho foi melhorar a estabilidade da curcumina natural.

O primeiro teste realizado foi o de estabilidade frente a diferentes doses de luz. Este experimento foi feito para analisar o efeito da luz (450 nm) diante as nanopartículas de PLGA-CURC e solução aquosa de curcumina natural. Como a luz possui o efeito de degradar a curcumina, pois ela é fotossensível, era esperado que houvesse degradação de ambas as amostras. O que se analisou foi o quão uma amostra degradou mais que a outra perante o tempo de iluminação, e o quão estável uma formulação foi diante de um fator que lhe causa desestabilidade.

Foram feitos dois experimentos, primeiro com a formulação PLGA-CURC1 e uma solução aquosa de curcumina natural, ambas com concentração de curcumina de 8 µg/mL. Nelas foram irradiadas duas doses de luz, 21 e 42 J/cm², referente a 10 e 20 minutos, respectivamente. Essas doses são referentes aos ensaios microbiológicos. Os resultados (Figura 12) mostram que a degradação da solução de curcumina foi maior em relação a degradação das nanopartículas contendo a curcumina, pois a presença do pico desse FS (430 nm) foi mais evidente nas PLGA-CURC1, indicando maior concentração do mesmo naquela amostra.

Figura 12 - Decaimento da concentração de curcumina natural em solução aquosa e PLGA-CURC1 frente a dois tempos de iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

O segundo experimento foi feito com PLGA-CURC2, PLGA-CURC3 e novamente uma solução aquosa de curcumina natural, todas com concentração de 0,8 mg/mL. O total de dose de luz entregue foi igual ao primeiro, 42 J/cm², porém para melhorar o aspecto do gráfico, foram feitos mais pontos, isto é, o tempo total de 20 minutos de iluminação foi mais fragmentado (Figura 13), com iluminação de 2 em 2 minutos. Com isso, foi possível fazer o ajuste de uma exponencial em todos os pontos, gerando uma taxa de degradação (τ). Através do τ de cada amostra conclui-se que a solução aquosa de curcumina natural degradou mais rapidamente com a luz, e a suspensão PLGA-CURC3 foi a que degradou mais lentamente. Este resultado já era esperado, uma vez que já era sabido que o polímero exerceria certa proteção contra a degradação causada pela luz azul e, como o PLGA-CURC3 tem uma camada a mais de polímero (PAH), era esperado que esta formulação fosse a mais protegida.

Figura 13 - Absorbâncias normalizadas das três amostras de curcumina natural frente diversos tempos de iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

A taxa τ da solução com a curcumina natural livre de $4,20 \pm 0,10$, para PLGA-CURC2 teve-se um τ de $5,22 \pm 0,54$, e para PLGA-CURC3, um τ de $5,70 \pm 0,68$. O maior τ , é da amostra mais lentamente degradada. A Figura 14 apresenta os espectros de absorção da solução de curcumina e das PLGA-CURC2 em função do tempo de iluminação.

Figura 14 - Espectros de absorção em função do tempo de iluminação. (A) solução aquosa de curcumina natural, (B) PLGA-CURC2.

Fonte: Elaborada pela autora.

O segundo teste foi para analisar a estabilidade da curcumina natural frente a diferentes concentrações de oxigênio e a luz (450 nm). Isto foi feito porque a presença do oxigênio é um dos principais fatores para a ocorrência da terapia fotodinâmica. Para verificar se a concentração de oxigênio era um fator importante para maior ou menor degradação, foram testadas diferentes condições, com diferentes concentrações de oxigênio, a fim de analisar o quão relevante essa alteração de concentração seria para a atividade fotodinâmica do FS. Esse teste foi feito apenas com a solução alcoólica de curcumina natural diluída em água MilliQ, para investigar tal parâmetro primeiramente no FS livre e somente depois nas

nanopartículas de PLGA. Dependendo do resultado, não seria necessário continuar o teste com as partículas encapsuladas. A concentração de oxigênio de cada amostra foi medida através de um equipamento denominado oxímetro. As amostras foram vedadas com tampa e PVC para que houvesse mínima troca de ar entre o ambiente externo e o interno.

Foram feitas três condições com cada solução de curcumina natural (solução aquosa):

- Sem alterar a concentração de oxigênio já existente na solução (6-7 mg/mL de O₂);
- Retirando a maioria do oxigênio da solução, através do borbulho do gás argônio (0,86 mg/mL de O₂);
- Saturando a solução, através do borbulho do gás oxigênio (20 mg/mL).

Todas as amostras foram iluminadas com o equipamento biotable no comprimento de onda de 450 nm, com intensidade de 35 mW/cm². O gráfico final foi feito com as absorbâncias observadas no pico de 430 nm em espectrometria UV-Vis. A iluminação e as medidas do espectro de absorbância foram realizadas de 2 em 2 minutos até o tempo total de 20 minutos (tempo máximo utilizado nos ensaios microbiológicos), totalizando uma dose de luz de 42J/cm² (equivalente a 20 minutos de iluminação). O gráfico com os resultados (tempo de iluminação x absorbância) validou a degradação sofrida pela curcumina natural, pois os espectros de absorbância foram diminuindo conforme o tempo de iluminação aumentasse. As três amostras, cada uma com a sua condição, foram colocadas no mesmo gráfico para comparação dos resultados. Por meio do ajuste, foi possível calcular a taxa de degradação (τ) de cada amostra avaliada (Figura 15).

Figura 15 - Espectro de absorvância normalizada da amostra de curcumina natural com diferentes concentrações de oxigênio em diferentes tempos de iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

A constante de degradação (τ) encontrada para a curcumina natural em solução aquosa sem alteração na concentração de oxigênio foi de 3,39 min.; para solução com pouco oxigênio foi de 4,53 min.; e por último, para solução saturada de oxigênio foi de 3,27 min.. Com esses resultados, foi possível verificar que essas concentrações de oxigênio utilizadas não foram importantes para maior ou menor degradação da solução. As taxas τ foram bem semelhantes, sendo a maior a da solução com pouco oxigênio (4,53), resultando a mais lentamente degradada. Porém, como os resultados tiveram valores bem próximos, nas concentrações de oxigênio e curcumina natural utilizada, o fator oxigênio não foi muito importante e por isso este ensaio não foi realizado com as nanopartículas de PLGA com FS.

Foi também calculada a quantidade de moléculas de curcumina natural e de oxigênio que havia em cada condição testada, e quantas moléculas de FS para cada molécula de oxigênio. Esse cálculo foi feito da seguinte maneira:

1 mol/mL de curc. – 341,35 g/mL; a concentração de FS utilizada foi de 8 $\mu\text{g/mL}$ equivalente a $2,34 \times 10^{-8}$ mol/mL.

Para concentrações baixas de oxigênio, 0,85 mg/mL, o equivalente foi de $2,65 \times 10^{-4}$ mol/mL. Calculando a razão molar da curcumina natural por O₂ temos:

$$R = \frac{\text{Curc}}{\text{oxigênio}} = \frac{2,34 \times 10^{-8}}{2,65 \times 10^{-4}} = 8,83 \times 10^{-4} \text{ curc/oxigênio}$$

Isso nos esclarece que há $8,83 \times 10^{-4}$ mols de curcucumina natural para 1 mol de oxigênio.

Para concentrações normais de oxigênio, 6 mg/mL, o equivalente foi de $1,87 \times 10^{-4}$ mol/mL. Calculando temos:

$$R = \frac{\text{Curc}}{\text{oxigênio}} = \frac{2,34 \times 10^{-8}}{1,87 \times 10^{-4}} = 1,25 \times 10^{-4} \text{ curc/oxigênio}$$

Para concentrações saturadas de oxigênio, 20 mg/mL, o equivalente foi de $6,25 \times 10^{-4}$ mol/mL. E novamente obtemos:

$$R = \frac{\text{Curc}}{\text{oxigênio}} = \frac{2,34 \times 10^{-8}}{6,25 \times 10^{-4}} = 3,75 \times 10^{-5} \text{ curc/oxigênio}$$

Com os cálculos em cada condição, conclui-se que a concentração de mols de FS foi menor em todas as condições avaliadas, em relação à concentração de mols de oxigênio. Para uma melhor elucidação, seria apropriado ter as mesmas quantidades de mols, para melhor comparação.

Por último, foram testadas duas variáveis, o tempo e a temperatura. Primeiramente foi feito o ensaio com a PLGA-CURC1 e a curcumina natural em solução aquosa. Cada uma das formulações teve uma amostra deixada na geladeira (4°C), e outra a temperatura ambiente de 25°C , ambas protegidas da luz. Estas quatro amostras ficaram estocadas durante 1 mês, e suas absorbâncias foram verificadas durante esse intervalo de tempo. A PLGA-CURC2 também foi testada juntamente com uma solução de curcumina natural em solução aquosa, porém, no lugar de deixá-las à temperatura ambiente, as duas amostras foram colocadas dentro de uma estufa com temperatura controlada de 37°C , protegidas da luz. Adjacente a essas condições, também foram deixadas duas amostras de cada formulação dentro da geladeira, como feito anteriormente. As quatro amostras ficaram 1 mês nas condições descritas, e tiveram suas absorbâncias verificadas durante esse intervalo de tempo.

O intuito desse ensaio foi verificar principalmente se a temperatura é um fator importante, isto é, se a estocagem em temperaturas mais altas ou baixas seria relevante para estabilidade da curcumina natural, estando ela livre ou encapsulada. Além disso, com as amostras em geladeira, pode-se comparar uma síntese recém preparada com uma após um mês de estocagem, verificando se o fator tempo seria importante também. Os resultados dos

espectros de absorvância de cada amostra e cada formulação foram colocados em gráficos para melhor elucidação da comparação. Por meio do ajuste dos gráficos foi possível calcular a taxa de degradação (τ) de cada amostra. Os gráficos do primeiro experimento estão presentes nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Amostras de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural estocadas à temperatura ambiente num intervalo de 31 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Amostras de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em geladeira (4°C) num intervalo de 31 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

O ajuste feito com os pontos resultantes foi uma exponencial de duas variáveis, isso pode ser explicado pelo fato da temperatura exercer degradação nas formulações, aumentando o estado vibracional das moléculas, e no meio que elas estão aumentando a mobilidade da solução. Por isso, para cada curva fitada, foram encontrados dois valores de C_0 (concentração mínima atingida) e dois de τ (constante de degradação).

Através da derivada de C_0 pelo tempo de degradação foi encontrada a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural (denominada de A), em ambas as amostras, então temos:

Para solução aquosa de curcumina natural:

$$C_{01} = 0,80 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau_1 = 2,46 \text{ dias}$$

$$C_{02} = 0,80 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau_2 = 2,46 \text{ dias}$$

A derivada de cada variável foi somada para achar o valor total de A_{curc} , a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural:

$$A_{\text{curc}} = \frac{d(C_{01})}{dt} + \frac{d(C_{02})}{dt} = \left(\frac{C_{01}}{\tau_1} \right) + \left(\frac{C_{02}}{\tau_2} \right) = 6,25 \text{ } \mu\text{g/mL por dia}$$

Para a suspensão de PLGA-CURC1:

$$C_{01} = 1,65 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau_1 = 51,26 \text{ dias}$$

$$C_{02} = 3,48 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau_2 = 0,56 \text{ dias}$$

A derivada de cada variável foi somada para encontrar o valor total de A_{PLGA} , a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural dentro das nanopartículas de PLGA:

$$A_{\text{PLGA}} = \frac{d(C_{01})}{dt} + \frac{d(C_{02})}{dt} = \left(\frac{C_{01}}{\tau_1} \right) + \left(\frac{C_{02}}{\tau_2} \right) = 0,64 \text{ } \mu\text{g/mL por dia}$$

Com os cálculos das velocidades de degradação feitos, foi possível verificar que, à temperatura ambiente, a curcumina natural encapsulada demorou mais para degradar comparada com a solução livre, pois encapsulada a velocidade de degradação foi quase dez

vezes menor. Com esse ensaio foi possível comprovar que o fator temperatura para o composto curcumina natural é extremamente importante.

Concomitantemente realizou-se o ensaio com as amostras estocadas em geladeira. O mesmo procedimento foi também realizado com essas amostras, suas absorbâncias foram colocadas em gráfico para cálculo da velocidade de degradação de cada uma. Porém, como o fator temperatura não foi presente nessa condição, por estarem em temperatura baixa, os pontos no gráfico tiveram seu ajuste por uma exponencial com apenas um valor de variável, isto é, um valor para C_0 e um para τ .

Para solução aquosa de curcumina natural:

$$C_0 = 1,42 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau = 4,40 \text{ dias}$$

A derivada da C_0 pelo tempo (τ) foi realizada para encontrar o valor total de A, a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural:

$$A_{\text{curc}} = \frac{d(C_0)}{dt} = \frac{1,42}{4,40} = 0,32 \text{ } \mu\text{g/mL por dia}$$

Para a suspensão de PLGA-CURC1:

$$C_0 = 0,66 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad \tau = 4,39 \text{ dias}$$

A derivada foi feita a fim de encontrar o valor total de A, a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural dentro das nanopartículas de PLGA:

$$A_{\text{PLGA}} = \frac{d(C_0)}{dt} = \frac{0,66}{4,39} = 0,15 \text{ } \mu\text{g/mL por dia}$$

Comparando os resultados das duas condições, foi possível confirmar que a temperatura é um fator de grande importância para a estabilidade da curcumina natural, uma vez que os valores encontrados na condição geladeira foram inferiores em relação aos na condição temperatura ambiente. Vale ressaltar que em todas as condições, verificou-se que a curcumina natural encapsulada apresentou maior estabilidade, pois sua velocidade de degradação foi menor em todas as condições. Com isso, é possível considerar que o

encapsulamento do FS em nanopartículas de PLGA uma alternativa para aumentar a estabilidade quando estocado em solução, pois é bem mais conservado quando se encontra dentro das nanopartículas, como se essas exercem uma proteção contra fatores externos que podem desestabilizar o FS.

Os resultados das PLGA-CURC2 foram processados da mesma forma como descrito anteriormente, foram encontrados resultados semelhantes aos já testados anteriormente, porém nesse ensaio, a temperatura foi maior, pois as amostras ficaram em estufa à 37°C. Assim como na primeira condição descrita, as amostras que estavam em estufa tiveram seus pontos resultantes de um ajuste exponencial com duas variáveis, tendo dois valores para C_0 e τ (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Amostras de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em estufa à 37°C num intervalo de 39 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Amostras de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural estocadas em geladeira à 4°C num intervalo de 39 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para solução aquosa de curcumina natural:

$$C_{01} = 1,07 \mu\text{g/mL} \quad \tau_1 = 0,01 \text{ dias}$$

$$C_{02} = 43,87 \mu\text{g/mL} \quad \tau_2 = 256,56 \text{ dias}$$

A derivada de cada variável foi somada para achar o valor total de A_{curc} , a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural:

$$A_{\text{curc}} = \frac{d(C_{01})}{dt} + \frac{d(C_{02})}{dt} = \left(\frac{C_{01}}{\tau_1} \right) + \left(\frac{C_{02}}{\tau_2} \right) = 107,17 \mu\text{g/mL por dia}$$

Para a suspensão de PLGA-CURC2:

$$C_{01} = 2,02 \mu\text{g/mL} \quad \tau_1 = 2,08 \text{ dias}$$

$$C_{02} = 15,53 \mu\text{g/mL} \quad \tau_2 = 55,72 \text{ dias}$$

A derivada de cada variável foi somada para encontrar o valor total de A_{PLGA} , a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural dentro das nanopartículas de PLGA:

$$A_{PLGA} = \frac{d(C01)}{dt} + \frac{d(c02)}{dt} = \left(\frac{C01}{\tau1}\right) + \left(\frac{C02}{\tau2}\right) = 1,25 \mu\text{g/mL por dia}$$

As amostras estocadas em geladeira também passaram pelo mesmo procedimento realizado com amostras da estufa, suas absorbâncias foram colocadas em gráfico para cálculo da velocidade de degradação de cada uma. Porém, como já descrito, o fator temperatura não foi presente nessa condição, por causa da baixa temperatura, os pontos no gráfico tiveram seu ajuste por meio de uma exponencial com apenas um valor de variável, isto é, um valor para C_0 e um para τ .

Para solução aquosa de curcumina natural:

$$C_0 = 9,94 \mu\text{g/mL} \quad \tau = 6,03 \text{ dias}$$

A derivada da C_0 pelo tempo (τ) foi realizada para encontrar o valor total de A, a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural:

$$A_{\text{curc}} = \frac{d(C_0)}{dt} = \frac{9,94}{6,03} = 1,65 \mu\text{g/mL por dia}$$

Para a suspensão de PLGA-CURC2:

$$C_0 = 70,26 \mu\text{g/mL} \quad \tau = 193,69 \text{ dias}$$

A derivada foi feita a fim de encontrar o valor total de A, a velocidade de decaimento da atividade da curcumina natural dentro das nanopartículas de PLGA:

$$A_{PLGA} = \frac{d(C_0)}{dt} = \frac{70,26}{193,69} = 0,36 \mu\text{g/mL por dia}$$

Portanto, observando os resultados de estabilidades juntos, é possível concluir que na temperatura mais elevada, de 37°C, a degradação do FS foi maior, isto é, sua estabilidade é dependente da temperatura, pois com essa temperatura maior encontrou-se uma velocidade de degradação maior que as primeiras com PLGA-CURC1. Enquanto que em temperaturas mais baixas, a velocidade permaneceu menor em relação à condição estufa. Como nos primeiros experimentos, as nanopartículas de PLGA retardaram a degradação acelerada da curcumina

natural, serviram como proteção contra o fator temperatura principalmente. Com todos os experimentos prontos, verificou-se que a temperatura é um componente de grande importância para melhorar a estabilidade da curcumina natural, que dependendo da variância de agitação das moléculas e do meio, isso aumentaria a velocidade de degradação do FS. Ainda, julgou-se que o sistema polimérico ajudou na estabilidade térmica do FS, retardando sua rápida degradação em solução.

A metodologia empregada na segunda etapa de experimentos, com o PLGA-CURC2, teve a diferença de que as leituras feitas no espectrofotômetro UV-Vis foram em etanol ao invés de água MilliQ, que foi o caso do primeiro experimento com PLGA-CURC1. Isso pode modificar os resultados, porque o diluente é um solvente que a curcumina natural é melhor solubilizada. Essa metodologia empregada no intuito de degradar as nanopartículas, para que o conteúdo interno fosse liberado e lido no equipamento UV-Vis, uma vez que em presença de solvente a rede de polímeros feita fica desestabilizada e acaba cedendo, estourando a nanopartícula.

5.2 Inativação fotodinâmica dos microrganismos

5.2.1 Bactéria Gram-positiva – *Staphylococcus aureus*

Os testes microbiológicos utilizando bactéria Gram-positiva foram feitos em *S. aureus* que é uma bactéria muito utilizada em ensaios com microrganismos, pois é facilmente manipulada e conservada. As nanopartículas PLGA-CURC1 foram as primeiras a serem testadas em duas concentrações diferentes (0,1 e 1 µg/mL) com dois tempos de incubação (1 e 5 horas) e duas doses energéticas (21 e 42 J/cm²). Todo experimento que envolveu as nanopartículas, foi realizado concomitantemente com solução aquosa de curcumina, nas mesmas condições, com o mesmo inóculo de bactéria. O tempo de incubação escolhido foi determinado após experimentos pilotos com 10 horas de incubação, e com os resultados obtidos foram escolhidos os melhores tempos, 1 e 5 horas, já que não houve muita diferença após 5 horas de incubação. Cada condição foi testada em triplicata, em 3 dias diferentes com 3 inóculos diferentes de bactéria. Os resultados são mostrados nas Figuras 20 e 21, onde há a viabilidade celular do microrganismo representada em escala logarítmica.

Em todos os experimentos foram feitos o grupo controle, que continha somente bactéria em PBS, o grupo controle da luz, o grupo controle do FS (livre e encapsulado) e o grupo IFD. Nestes primeiros experimentos com as PLGA-CURC1 as duas concentrações

foram escolhidas com base na curva de liberação, isto é, foi visto quanto de curcumina natural teria livre no meio em 1 hora e em 5 horas. As nanopartículas foram colocadas em uma concentração que já estavam, de 0,8 $\mu\text{g/mL}$, e a solução de curcumina foi colocada a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para a primeira hora de incubação (simulando a quantidade de FS que estaria no meio) e 1 $\mu\text{g/mL}$ na quinta hora.

Figura 20 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora e 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas e 1 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com os gráficos foi possível analisar as duas condições testadas. Na primeira condição, apenas a curcumina natural encapsulada (PLGA-CURC1) teve ação sob as bactérias Gram-positivas, diminuindo 6 logs de microrganismos nos primeiros 10 minutos de iluminação, uma resposta muito boa. Ao contrário desta formulação, a solução com o FS livre em baixas concentrações não teve ação sob as bactérias. Aumentando a concentração e o tempo de incubação, obteve-se uma resposta positiva de ambas as formulações, com destaque maior para curcumina natural livre, que inativou completamente a bactéria (redução de 8 logs) com 20 minutos de iluminação, não crescendo colônias. As nanopartículas PLGA-CURC1 mantiveram a mesma ação, diminuindo de 6 a 7 logs.

Em seguida, as PLGA-CURC2 foram testadas, porém com novas condições de concentração. Com essa nova síntese foram testadas duas concentrações iniciais, tanto as nanopartículas quanto a solução de FS começaram o ensaio com a mesma concentração, com dois tempos de incubação (1 e 5 horas) e dois tempos de iluminação (10 e 20 minutos equivalentes à 21 e 42 J/cm^2 , respectivamente). As novas concentrações foram de 7 $\mu\text{g/mL}$ e uma mais alta de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 22, 23, 24 e 25). A maior concentração foi escolhida para verificar se a curcumina natural (livre e encapsulada) teria algum efeito tóxico, no escuro, sob as células bacterianas, quando estivesse em altas concentrações.

Figura 22 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 hora a 7 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 hora a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a primeira condição, com a concentração de 7 µg/mL em 1 hora de incubação, ambas as formulações foram muito eficazes na inativação bacteriana, reduzindo 8 logs nos primeiros 10 minutos de iluminação. Com 5 horas de incubação, a eficácia das duas formulações foi mantida, com apenas um pequeno crescimento na primeira etapa do tratamento, primeiros 10 minutos de iluminação, da solução de FS livre, que pode ser considerado mínimo, pois não inativa 1 log. Na segunda condição, com concentração de 500 µg/mL, na primeira hora, teve-se ação da solução de curcumina natural livre no escuro, apresentando redução de 4 logs. Esta ação, na ausência de luz é uma característica não desejada em um FS, pois sua atividade deve iniciar apenas quando há irradiação, caso contrário, o composto se torna tóxico e não exclusivo para uso na terapia fotodinâmica. Estes acontecimentos podem ter ocorrido pela alta concentração de curcumina natural, que estava tão concentrada que acabou sendo tóxica no escuro, e, além disso, pode ter havido agregação do FS, que acabou perdendo sua atividade fotodinâmica não mostrando diferença na viabilidade celular das bactérias após a excitação com luz azul. Ao contrário, as PLGA-CURC2, com concentração de 500 µg/mL e 1 hora de incubação mostrou-se eficiente, e com sua atividade cada vez melhor conforme a entrega de mais doses energéticas. Outro fato importante foi que mesmo em alta concentração, a curcumina natural encapsulada no PLGA não apresentou ação tóxica no escuro, sendo completamente preservada dentro das nanopartículas. Com 5 horas de incubação, nessa mesma concentração, a solução de FS livre permaneceu tóxica no escuro, e com pouca ativação após a incidência de luz (redução de apenas 2 logs). Já as PLGA-CURC2 tiveram ação total sob as células bacterianas com 20 minutos de iluminação, inativando todas as unidades formadoras de colônia (redução de 8 logs).

Com esses resultados, foi possível afirmar que as nanopartículas PLGA-CURC2 foram mais seguras em altas concentrações, pois, além de não serem tóxicas no escuro, não agregaram, e não perderam sua atividade fotodinâmica.

Como as nanopartículas PLGA-CURC2 foram liofilizadas, ao contrário da primeira síntese, o pó de PLGA-CURC2, após a liofilização, foi diluído em água MilliQ novamente, e sua solubilização manteve-se como após a preparação. Por isso, foram feitos novos testes com as nanopartículas recém preparadas e com as liofilizadas, a fim de verificar se a atividade fotodinâmica da curcumina natural seria modificada por causa de mais um processo. Foram realizadas as mesmas condições testadas anteriormente, com duas concentrações (7 µg/mL e 500 µg/mL), dois tempos de incubação e iluminação. Os resultados apresentados nas Figuras 26, 27, 28 e 29 foram comparados com uma síntese recém preparada.

Figura 26 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizada com incubação de 1 hora a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 - Viabilidade celular da bactéria *S. aureus* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e PLGA-CURC2 liofilizada com incubação de 5 horas a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando os resultados obtidos, a maior diferença ocorrida foi na condição com concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 1 hora de incubação, ao contrário da síntese recém preparada, as nanopartículas realizaram completa inativação das bactérias nos primeiros 10 minutos de tratamento fotodinâmico, apresentando uma ação melhorada. Nas demais condições, as duas formulações foram bem semelhantes, apenas apresentando um pequeno crescimento (2 logs) na condição de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nas duas incubações, porém com inativação total no final do tratamento.

Terminado todos os experimentos com a *S. aureus*, foi possível concluir que encapsulando a curcumina natural em nanopartículas de polímero PLGA sua atividade fotodinâmica não foi perdida e, além disso, em algumas situações foi até melhorada. Isto era esperado, que sua atividade fosse igual ou melhor que a do FS livre.

5.2.2 Bactéria Gram-negativa – *Escherichia coli*

Existe um grande desafio no controle de bactérias Gram-negativas, por causa da sua estrutura celular que as deixam mais resistentes à entrada de compostos, dificultando sua morte. Enquanto as bactérias Gram-positivas apresentam parede celular porosa de peptideoglicanos que cerca a membrana citoplasmática (140-141), as Gram-negativas apresentam uma membrana a mais, uma membrana exterior à fina camada de peptideoglicanos e à membrana citoplasmática, resultando em maior dificuldade de permeabilidade para pequenas moléculas.(142) Essa membrana exterior das bactérias Gram-negativas desempenha um papel importante, muitas vezes relacionada com a resistência a antibióticos que são altamente eficazes contra as bactérias Gram-positivas, por exemplo, rifamicina. Isso explica a maior prevalência de infecções de Gram-negativas no ambiente hospitalar atualmente.(143)

Por consequência, a inativação fotodinâmica também sofre um maior desafio para atingir as Gram-negativas, pois o FS, muitas vezes, não consegue ultrapassar as paredes das bactérias para chegarem na membrana ou no citoplasma. Assim, a inativação fotodinâmica de bactérias Gram-positivas é definitivamente mais fácil de ser conseguida do que as de bactérias Gram-negativas. Neste contexto, torna-se mais difícil obter um FS que seja altamente potente para inativar esse grupo de bactérias, uma vez que a sua barreira da membrana impede a absorção de FS neutros e/ou aniônicos.(144) Minnock, A. et. al. (135) reportou uma eficiente inativação fotodinâmica com as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, quando estas foram incubadas com ftalocianinas de zinco piridínio catiônicas solúveis em água,

porém, não obteve o mesmo sucesso quando foram incubadas com um produto neutro de ftalocianinas sulfonadas ou ftalocianinas carregadas negativamente. Outros reportaram que a incubação de *E. coli* com uma ftalocianina catiônica no escuro causou alterações na permeabilidade da membrana exterior e isto aumentou a incorporação de compostos hidrófobos.(136)

Um fotossensibilizador ideal para inativação fotodinâmica deve possuir propriedades fotofísicas apropriadas, tais como uma banda de absorção larga, grande comprimento de onda, elevado rendimento quântico para a geração de oxigênio tripleto de vida longa e estados excitados de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são citotóxicas. Também deve ser solúvel em água e deve ter elevada afinidade para as células microbianas e baixa para as células hospedeiras. Estas características estão fortemente relacionadas com a presença de cargas catiônicas na estrutura molecular.(145) Vários pesquisadores observaram que a carga e a estrutura do fotossensibilizador podem ser fatores importantes para determinar o sucesso da IFD.(69,146)

Caminos, et al.(147) relatou que os derivados de porfirinas catiônicas selecionados induziram morte direta de Gram-positivas e também de Gram-negativas. Este tipo de porfirinas foi capaz de inativar diretamente as células da Gram-negativas sem a presença de outro aditivo. A carga positiva na molécula do FS promoveu uma interação eletrostática com canais de carga negativa presentes na superfície externa das células bacterianas, aumentando a eficiência do processo de IFD.(147-148)

Por causa desse maior desafio em inativar bactérias Gram-negativas, foi feita uma nova síntese, das PLGA-CURC3, as quais possuem uma camada extra de polímero PAH que foi colocada sob as nanopartículas da síntese 2, deixando-as com carga de superfície positiva. Com essa mudança na estrutura das partículas, elas foram testadas nas mesmas condições citadas anteriormente, duas concentrações (7 µg/mL e 500 µg/mL) com duas incubações e dois tempos de luz. Nos experimentos, a solução aquosa de curcumina natural também foi testada para posterior comparação e análise (Figuras 31, 32, 33 e 34). Antes da síntese 3, as nanopartículas PLGA-CURC1 foram testadas com a bactéria Gram-negativa, nas mesmas condições que já tinham sido testadas e, o resultado foi negativo, como já era esperado, pois a curcumina natural não possui atividade fotodinâmica frente a *E. coli* (Figura 30).

Figura 30 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas e $1 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a $7 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 32 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 34 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CURC3 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os gráficos dos resultados, foi possível confirmar que a presença de carga positiva na superfície das nanopartículas fez com que a curcumina natural conseguisse exercer sua ação fotodinâmica sob as bactérias *E. coli*. Na Figura 30, constatou-se que nem a solução com o FS e nem as PLGA-CURC2, de carga negativa, tiveram ação sob a mortalidade das células bacterianas, o que já era esperado. Ao serem testadas partículas com a superfície modificada, verificou-se que com a menor concentração de 7 µg/mL, na primeira e quinta hora de incubação, o FS encapsulado apresentou ação, sendo ela gradativa com o aumento das doses energéticas, resultando em redução de 6,5 logs. Os resultados com a maior concentração, de 500 µg/mL, durante as duas incubações, também apresentaram atividade fotodinâmica semelhante a condição de menor concentração, porém, assim como nas bactérias Gram-positivas, a concentração de 0,5 mg/mL foi menos eficiente, diminuindo 4 logs, o que é um resultado positivo, mas comparando com os outros, teve eficiência inferior.

Assim como feito anteriormente, as PLGA-CURC3 foram testadas e comparadas após o processo de liofilização (Figuras 35 e 36), nas melhores condições obtidas.

Figura 35 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CUR3 e PLGA-CURC3 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 36 - Viabilidade celular da bactéria *E. coli* com os tratamentos de PLGA-CUR3 e PLGA-CURC3 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados com as nanopartículas liofilizadas nas melhores condições mostraram que após o processo de liofilização houve pequena melhora da atividade fotodinâmica do FS encapsulado, porém nada muito relevante. A ação na bactéria se manteve ótima.

Com todos os resultados obtidos, observou-se que através da mudança de carga na superfície da nanopartículas a curcumina natural encapsulada conseguiu apresentar atividade fotodinâmica sob as cepas de *E. coli*, algo que em solução na forma livre não é atingindo. O fato de poder alterar a superfície das nanopartículas com uma camada extra de polímero, ou através da colocação de grupos específicos, é uma característica positiva, pois a formulação pode ser adaptada dependendo do alvo escolhido, sendo mais específica e restrita para o tratamento.

5.2.3 Fungo – *Candida albicans*

Após todos os experimentos realizados com as bactérias, as mesmas condições feitas com cada formulação foram repetidas com o fungo *C. albicans*. A inativação de fungos costuma ser mais difícil comparada com a inativação das bactérias, pois os fungos possuem estrutura celular diferente, são maiores, de 25 a 50 vezes maiores do que as bactérias, contendo um grande número de alvos por célula para inativação fotodinâmica (4) e alguns têm a capacidade de formarem biofilmes, dificultando a interação e/ou entrada de compostos. Os gráficos abaixo (Figuras 37 e 38) mostram os resultados dos testes com PLGA-CURC1 e seu comparativo da solução aquosa de curcumina natural.

Figura 37 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a $0,1 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 38 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC1 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a $1 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios com as nanopartículas da síntese 1 se mostraram ineficientes para a inativação do fungo, em ambas as condições, não resultando em diminuição da viabilidade desse microrganismo. Com isso, as PLGA-CURC2 foram testadas (Figuras 39, 40, 41 e 42) nas mesmas condições anteriormente descritas com as bactérias, também com um comparativo do FS livre em meio aquoso.

Figura 39 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 1 hora a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 42 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CURC2 e solução aquosa de curcumina natural com incubação de 5 horas a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados com as PLGA-CURC2 mostraram que o aumento da concentração do FS tanto encapsulado quanto livre, fez com que houvesse redução das células viáveis bacterianas, ocorrendo inativação fotodinâmica do fungo. Na primeira condição, à 7 µg/mL, com 1 hora de incubação teve-se a mortalidade completa do fungo com a solução de FS livre, enquanto que nas nanopartículas houve um baixíssimo crescimento do microrganismo, menor que 1 log. Logo, ambas as formulações foram eficientes. Com 5 horas de incubação, foi visto que a atividade da solução de curcumina natural é diminuída, pois ocorre redução de 3 logs, enquanto a das PLGA-CURC2 é mantida muito semelhante com a primeira hora de incubação. Em solução, a curcumina natural pode ter agregado ou desestabilizado durante esse intervalo de incubação, que pode ter gerado uma queda em sua ação antimicrobiana. Na segunda condição, à 500 µg/mL, observou-se uma ação semelhante ao resultado com as bactérias Gram-positivas, ação tóxica do FS (em meio aquoso) no escuro. Em ambas as incubações, a solução de curcumina natural apresentou atividade no escuro, algo não desejado para um FS utilizado na inativação de microrganismos. Já as PLGA-CURC2 não apresentaram atividade em ambiente escuro, tendo ação apenas no início do tratamento com

as doses energéticas, sendo mais eficaz com 5 horas de incubação, pois já inativou completamente o fungo nos primeiros 10 minutos de irradiação de luz.

O experimento seguinte foi realizado com as PLGA-CURC2 liofilizadas para comparação com a síntese, como dito anteriormente (Figuras 43, 44, 45 e 46).

Figura 43 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 7 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 44 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 7 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 45 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 1 hora a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 46 - Viabilidade celular do fungo *C. albicans* com os tratamentos de PLGA-CUR2 e PLGA-CURC2 liofilizado com incubação de 5 horas a 500 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados do último experimento, notou-se que as condições que envolveram 1 hora de incubação, as PLGA-CURC2 liofilizadas foram melhores que as nanopartículas recém sintetizadas. Nas incubações de 5 horas, as liofilizadas tiveram ação menor em relação às PLGA-CURC2, porém, mesmo com essa diminuição, elas não perderam completamente sua atividade fotodinâmica no fungo.

De acordo com os resultados apresentados, constatou-se que a atividade da curcumina natural no fungo *C. albicans* foi maior nas concentrações acima de 0,1 e 1 µg/mL, porém, à 500 µg/mL, considerada uma alta concentração, o FS em solução apresentou ação tóxica no escuro, não sendo vantajoso para a terapia utilizada. Ao contrário, as sínteses que preservaram o FS no interior da rede de PLGA, apresentaram melhor resultado, não permitindo que ação do FS atingisse o microrganismo antes da ativação da luz.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a atividade combinada do polímero PLGA com o fotossensibilizador curcumina natural na inativação fotodinâmica de microrganismos. Foi demonstrado que o encapsulamento do FS em nanopartículas de PLGA através da nanoprecipitação na presença de Dextran como estabilizador ofereceu maior estabilidade para a formulação. Esse encapsulamento foi eficiente, em diferentes formas de preparo, com o FS em forma de pó e já dissolvido em solvente. As PLGA-CURC foram capazes de controlar e sustentar a liberação da CN durante um período de 58 horas (7 dias). Além disso, foi demonstrado que perante aos fatores de degradação testados (luz, concentração de oxigênio, temperatura e tempo) as PLGA-CURC se mantiveram mais estáveis que a solução aquosa de curcumina natural livre, já que o polímero exerceu proteção contra esses fatores, retardando a degradação precoce do FS. Nos ensaios microbiológicos, todas as formulações presentes desempenharam ótima ação fotodinâmica nos microrganismos testados, inativando praticamente todas as cepas nas condições experimentais (reduzindo todos os logs). Além disso, as mesmas não apresentaram ação tóxica no escuro, mesmo em altas concentrações, ao contrário da solução de FS livre, que foi tóxica. Esta característica foi muito importante para as formulações, pois é ideal um FS ser ativo apenas na presença da luz. Ressaltando ainda, as PLGA-CURC3 obtiveram sucesso na inativação das bactérias Gram-negativas, ação que não foi alcançada pela solução de curcumina natural. Assim, concluiu-se que foi possível deixar a curcumina natural solúvel em água através do encapsulamento em nanopartículas de PLGA, certificar a melhora na estabilidade em meio aquoso (estocagem), e que foram eficazes na inativação fotodinâmica de bactérias e fungo, demonstrando um elevado potencial destes novos sistemas para futuras aplicações.

REFERÊNCIAS

- 1 FOTINOS, N. et al. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1366-1373, 2008.
- 2 NORDMANN, P. et al. Does broad-spectrum-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 689-692, 2011.
- 3 HARRISON, J.W.; SVEC, T.A. The beginning of the end of the antibiotic era? Part II. Proposed solutions to antibiotic abuse. **Quintessence International**, v. 29, n. 4, p. 223-229, 1998.
- 4 DAI, T. et al. Photodynamic therapy for localized infections: state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.
- 5 ZOLFAGHARI, P.S. et al. In vivo killing of Staphylococcus aureus using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 27, 2009.
- 6 INADA, N. M. et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 60–68, 2012.
- 7 SKIVKA, L. M. et al. 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy of Lewis lung carcinoma: a role of tumor infiltration with different cells of immune system. **Experimental Oncology**, v. 26, n. 4, p. 312–3155, 2004.
- 8 DETTY, M.R. et al. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.
- 9 NAKSURIYA, O. et al. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3365–3383, 2014.
- 10 SILVA, A. P. et al. A promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 434–437, 2015.
- 11 KHALIL, N. M. et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 101, p. 353–360, 2013.
- 12 BRIGGER, I. et al. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631–651, 2002.

- 13 CHAWLA, J. S.; AMIJI, M.M. Biodegradable poly(ε-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 127–138, 2002.
 - 14 SAFRA, T. et al. patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg / m². **Annals of Internal Medicine**, p. 1029–1033, 2000.
 - 15 SCHROEDER, U. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1305–1307, 1998.
 - 16 RAGHUVANSHI, R.S. et al. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 245, n. 1-2, p. 109–121, 2002.
 - 17 FASSAS, A. et al. Safety and early efficacy assessment of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in adults with refractory or relapsed acute myeloblastic leukaemia: a phase I-II study. **British Journal of Haematology**, v. 116, n. 2, p. 308-315, 2002.
 - 18 KUMARI, A. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.
 - 19 ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505–515, 2008.
 - 20 GREF, R. et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1600–1603, 1994.
 - 21 BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 206–212, 2012.Supplement.
 - 22 PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, 2003.
 - 23 RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.
 - 24 CHEREDDY, K. K. et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, p. 208–15, 2013.
 - 25 VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology**, v. 25, n. 2, p. 1–14, 2001.
 - 26 MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216–2229, 2008.
 - 27 KONAN, Y. N. et al. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 115-124, 2003.
-

-
- 28 IO, D. Synthesis , characterization and in vitro degradation of poly (DL-Lactide)/ poly (DL-Lactide-co-Glycolide). **Turkish Journal of Chemistry**, v. 23, p. 153–161, 1999.
- 29 YALLAPU, M.M. et al. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, n. 1, p. 19–29, 2010.
- 30 QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113–1128, 1998.
- 31 KENNEDY, J.C. et al. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B:biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143–148, 1990.
- 32 TRNOBRANSKI, P.H. Are we facing a “post-antibiotic era”? -- a review of the literature regarding antimicrobial drug resistance. **Journal of Clinical Nursing**, v. 7, n. 5, p. 392–400, 1998.
- 33 WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana : Uma guerra perdida ? **Boletim de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.
- 34 AZAMBUJA, E. P. et al. Prevenção e controle da infecção hospitalar: as interfaces como o processo de formação do trabalhador. **Texto & Contexto - enfermagem**, v. 13, p. 79–86, 2004. numero especial.
- 35 JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468–481, 2006.
- 36 HERRMANN, M.; GAUDET, G. The economic dynamics of antibiotic efficacy under open access. **Journal of Environmental Economics and Management**, v. 57, p. 334–350, 2009.
- 37 HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.
- 38 GUILLEMOT, D. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 494–498, 1999.
- 39 ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697–705, 2005.
- 40 SOCHA, A. M. et al. Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 5, p. 1504–1507, 2009.
- 41 MELO, W.C.M.A.; PERUSSI, J.R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 331–340, 2012.
-

- 42 CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p.1342–1347, 2003. doi: 10.1056/NEJMoa025025
- 43 DOHMEN, P.M. Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimise surgical site infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, p. 15-20, 2008. Supplement 2.
- 44 ASLANI, M.M. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. e136–e139, 2011.
- 45 BROVKO, L. Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 61, p. 119-147, 2010. doi:10.1016/B978-0-12-374468-5.00003-9
- 46 TAO, R. et al. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in south China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 6, p. 2101–2109, 2010.
- 47 GONZÁLEZ-CANDELAS, F. et al. The evolution of antibiotic resistance. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**, 2011.p. 305-337. doi: 10.1016/B978-0-12-384890-1.00012-1.
- 48 HULSCHER, M.E. et al. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 167–175, 2010.
- 49 EGGIMANN, P. et al. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, 2003.
- 50 DONNELLY, R.F. et al. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1–12, 2008.
- 51 HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462–478, 1995.
- 52 OROZCO, A.S. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–9, 1998.
- 53 LIMA, I.D.O.; et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 2006.
- 54 ANTUNES, R. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517–524, 2006.
- 55 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2001.
-

-
- 56 HORA MACHADO, A.E. Da terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 57 FERRO, S. et al. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 5, p. 1026–1034, 2007.
- 58 RYSKOVA, L. et al. Photodynamic antimicrobial therapy. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 4, p. 400–406, 2010.
- 59 MANG, T.S. et al. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 98–105, 2010.
- 60 MELLO, R. et al. Reactions at interfaces: oxygenation of n-butyl ligands anchored on silica surfaces with methyl(trifluoromethyl)dioxirane. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 24, p. 10129–39, 2011.
- 61 ZHU, T.C.; FINLAY, J.C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 35, n. 7, p. 3127, 2008.
- 62 DENIS, T.G.ST. et al. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509–520, 2011.
- 63 ZHU, Z. et al. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p. 10856–7, 2008.
- 64 DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329–2335, 2005.
- 65 HARRIS, F.; PIERPOINT, L. Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent. **Medicinal Research Reviews**, n. 6, p. 1292–1327, 2012.
- 66 ITO, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells—a kinetic approach. **Photochemistry and Photobiology**, v. 34, n. 4, p. 521–524, 2008.
- 67 DAI, T. et al. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 38–44, 2010.
- 68 MAISCH, T. et al. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1542–52, 2005.
- 69 HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.
-

- 70 TANG, H.M. et al. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 87–91, 2007.
- 71 ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 274–8, 2001.
- 72 DOVIGO, L.N.; et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 123–30, 2011.
- 73 CALZAVARA-PINTON, P.G. et al. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology**, v. 78, n. 1, p. 1–6, 2005.
- 74 KUSSOVSKI, V.; et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 2, p. 133–140, 2009.
- 75 CASSIDY, C.M. et al. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 2, p. 71–80, 2009.
- 76 BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Effects of photoproducts on the binding properties of protoporphyrin IX to proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 77–87, 2002.
- 77 WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives: suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381–394, 2000.
- 78 TOBIN, A.E.; SANTAMARIA, J.D. An intensivist-led tracheostomy review team is associated with shorter decannulation time and length of stay: a prospective cohort study. **Critical Care**, v. 12, n. 2, p. R48, 2008.
- 79 STHAL, F.; BOURQUIN, R. Characterizing mechanical resonators by means of a scanning acoustic force microscope. **Applied Physics Letters**, v. 77, n. 12, p. 1792–1794, 2000.
- 80 DOVIGO, L.N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011.
- 81 CASTANO, A.P. et al. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- 82 DOVIGO, L.N. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 927–934, 2011.
- 83 CHAN, W.M. et al. Photodynamic therapy with verteporfin for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization: one-year results from a prospective case series. **Ophthalmology**, v. 110, n. 12, p. 2395–402, 2003.
-

-
- 84 DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 85 JORI, G.; BROWN, S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 403–405, 2004.
- 86 SIBATA, C.H. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 2, n. 6, p. 917–927, 2001.
- 87 ALLISON, R.R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 88 STELL, A J. et al. Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 164–169, 2001.
- 89 LUCROY, M.D. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. **Veterinary Clinics of North America - small animal practice**, v. 32, n. 3, p. 693–702, 2002.
- 90 SHARMAN, W.M. et al. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 11, p. 507–517, 1999.
- 91 MIQUEL, J.; et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. a review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, n. 1, p. 37–46, 2002.
- 92 BRUZELL, E.M. et al. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 4, n. 7, p. 523–530, 2005.
- 93 CAMPBELL, F.C.; COLLETT, G.P. Chemopreventive properties of curcumin. **Future Oncology**, v. 1, n. 3, p. 405–414, 2005.
- 94 AGGARWAL, B.B. et al. Curcumin: the indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 1–75, 2007.
- 95 KOLEV, T.M. et al. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 102, n. 6, p. 1069–1079, 2005.
- 96 PÉRET-ALMEIDA, L. et al. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 1039–1044, 2005.
- 97 PRIYADARSINI, K.I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.
-

- 98 HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 2009.
- 99 RIBEIRO, A.P.D. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 391–398, 2013.
- 100 SILVA, A.P. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomicose por terapia fotodinâmica** - estudo *in vitro* e clínico. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 101 CORREA, T.Q. **Efeito de diferentes fotossensibilizadores no controle de *Acanthamoeba polyphaga* *in vitro***. 2013. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- 102 HEGGE, A.B. et al. Evaluation of novel alginate foams as drug delivery systems in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) of infected wounds--an *in vitro* study: studies on curcumin and curcuminoides XL. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 8, p. 3499–513, 2010.
- 103 TEITEN, M.H. et al. Curcumin-the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. **Toxins**, v. 2, n. 1, p. 128-162, 2010..
- 104 KUMARI, A. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- 105 SAKATA, S.; et al. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733–737, 2007.
- 106 MOGHIMI, S.M. et al. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 2005.
- 107 BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163–171, 2000.
- 108 DUNNE, M. et al. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 1-2, p. 209–19, 2003.
- 109 TAO, S.L.; DESAI, T. A. Microfabricated drug delivery systems: From particles to pores. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 315–328, 2003.
- 110 SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
-

-
- 111 CARUTHERS, S.D. et al. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2007.
- 112 JAIN, K.K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. **Medical Principles and Practice**, v. 17, n. 2, p. 89–101, 2008.
- 113 Steve, M. H. et al. NIH Public Access. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1–19, 2012.
- 114 MÜLLER, C.R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555–560, 2004.
- 115 LIMA, A.M. **Encapsulação de fotossensibilizadores em nanopartículas lipídicas sólidas para maximização da eficiência fotodinâmica e fototoxicidade**. 2013. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 116 MÜLLER, C.R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555–560, 2004.
- 117 KONAN, Y.N. et al. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 3-4, p. 241–249, 2003.
- 118 O’CONNOR, A.E. et al. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.
- 119 CARRASQUILLO, K.G. et al. Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 3, p. 199–208, 2001.
- 120 FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 2009.
- 121 THOMAS, C. et al. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 405–415, 2011.
- 122 ZAMBAUX, M.F. et al. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 2-3, p. 179–188, 1999.
- 123 PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
- 124 BARICHELLO, J.M. et al. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 4, p. 471–476, 1999.
-

- 125 SOPPIMATH, K.S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001.
- 126 GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.
- 127 DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.
- 128 EERIKÄINEN, H. et al. Polymeric drug nanoparticles prepared by an aerosol flow reactor method. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, p. 136–143, 2004.
- 129 SHAIKH, J. et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 223–230, 2009.
- 130 WANG, Y.J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1997.
- 131 HOLZER, M. et al. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 428–437, 2009.
- 132 RANJAN, A.P. et al. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 38, p. 1-18, 2012. doi:10.1186/1477-3155-10-38.
- 133 BODDU, S.H.S. et al. Novel nanoparticulate gel formulations of steroids for the treatment of macular edema. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 37–48, 2010.
- 134 BOHREN, C.F.; HUFFMAN, D.R. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: Wiley, 1983.
- 135 MINNOCK, A. et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 32, n. 3, p. 159–164, 1996.
- 136 MINNOCK, A. et al. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 522–527, 2000.
- 137 MITTAL, G. et al. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 1, p. 77–85, 2007.
-

- 138 DRESSMAN, J. Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting: modification, characterization and in vivo distribution. **Journal of Controlled Release**, v. 18, n. 3, p. 279–280, 1992.
- 139 TSAI, T. et al. Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 316–322, 2009.
- 140 BOURRÉ, L. et al. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1613–1620, 2010.
- 141 LAMBERT, P.A Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 46S–54S, 2002. Supplement.
- 142 SHARMA, S.K. et al. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? **Nanomedicine**, v. 6, n. 10, p. 1813–1825, 2011.
- 143 NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, v. 49, n. 1, p. 1–32, 1985.
- 144 SPERANDIO, F.F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 1–23, 2013.
- 145 FU, X.-J. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 159157, 2013.
- 146 SOUKOS, N.S. et al. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2595–2601, 1998.
- 147 CAMINOS, D. A et al. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1071–1078, 2008.
- 148 MERCHAT, M. et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 32, n. 3, p. 153–157, 1996.
- 149 VAUTHIER, C. et al. Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation. **Journal of Nanoparticle Research**, v.1, n.3, p. 411–418, 1999.