

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta \_\_\_\_  
será disponibilizado somente a partir  
de 31/01/2025.



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



**Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez**

**Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana**

**Araraquara**

**2020**



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



**Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez**

**Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese.

**Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**

**Araraquara**

**2020**

T828d Trigo Gutierrez, Jeffersson Krishan  
Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de  
Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia  
Fotodinâmica antimicrobiana / Jeffersson Krishan Gutierrez Trigo. --  
Araraquara, 2020  
220 f. : il., tabs., fotos  
  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima  
  
1. Fotoquimioterapia. 2. Bactérias. 3. Fungos. 4. Luz. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de  
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez**

**Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral**

Presidente e orientador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

3º Examinador Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda

4º Examinador Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

5º Examinador Profa. Dra. Morgana R. Guimarães Stabili

Araraquara, 17 de dezembro de 2020.

## **DADOS CURRICULARES**

**Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez**

NASCIMENTO: 05/12/1983, La Paz-Bolívia

FILIAÇÃO: Angel Elias Trigo Velasco (Pai)  
Maria Concepción Gutierrez Hanco (Mãe)

2003-2009 Graduação em Odontologia *Universidad Mayor de San Andrés*, La Paz-Bolívia

2014-2016 Mestrado em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Araraquara. FOAr-UNESP

2017-2020 Doutorado em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Araraquara. FOAr-UNESP

A Deus porque sem ele nada é possível.

A minha amada família: meus Pais Angel e Maria, meus irmãos Beremiz e Hans. O amor de família nos manterá unidos sempre aconteça o que acontecer.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo amor, sacrifício e confiança que sempre tiveram, têm e terão em mim. Aos meus irmãos pela parceria, cumplicidade e suporte que sempre me deram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima pela paciência, dedicação e paixão com que ele ensina.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco pelo conhecimento compartilhado no laboratório dele.

Ao Italo Calori pela parceria e amizade feita durante a execução da pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, e todos os que são parte dessa família.

À equipe de pesquisa, Vinicius, Yuliana, Amanda, Geovana, Letícia, muito obrigado.

A todos os amigos que fiz nesta caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processos nº 2013/07276-1 e 18/02513-9 pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico processo nº 142184/2018-7 pela concessão da bolsa de estudo na primeira etapa do curso.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento nº 88887.481502/2020-00 e 88887.513641/2020-00. Agradeço ainda pela concessão da bolsa para a realização do estágio no exterior (Processo nº 88887.363662/2019-00).

Ao Instituto de Química de Araraquara, pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo, assim como ao técnico de microscopia Diego Tita.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho, gratidão.

“Na vida sempre teremos situações complicadas, o nosso dever é enfrentá-las com convicção e responsabilidade”

Angel Trigo, meu pai.

Trigo Gutierrez, JK. Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

Os nanocarregadores têm sido utilizados com sucesso para a veiculação de curcumina (CUR). No entanto, a demorada liberação do composto limita seu uso tópico como fotossensibilizador (FS) para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), na qual ainda são necessários longos tempos de pré-iluminação e iluminação. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema micelar fotoativado para liberação de CUR. As micelas foram sintetizadas pelo método de adição direta utilizando o polímero fotossensível formado por poli-etileno glicol como polímero e ácido 3-nitro-4-bromometilbenzoico como cromóforo e ácido fenoxiacético como extremo apolar (PEG-ANB-AFA), denominado polímero fotossensível (PFS). Adicionalmente, como controles, foram sintetizadas micelas convencionais de Pluronic® F127 ou P123. Os testes de caracterização por espectroscopia de absorção e fluorescência incluíram: determinação da Concentração Micelar Crítica, constante de ligação e supressão de fluorescência. As micelas de PFS apresentaram maior eficiência de encapsulamento (88,79%), enquanto que, para as micelas convencionais, foram observados valores de 77,52% para F127 e 72,58% para micelas de P123. O PFS apresentou fotodegradação gradativa com irradiação UV a 355 nm, fato que facilitou a liberação da CUR de dentro das micelas, o que melhorou a demorada liberação do sistema convencional. Os tamanhos na faixa nanométrica de 40,42; 22,90 e 20,78 nm para as micelas de PFS, F127 e P123 respectivamente, e índice de polidispersão de até 0,392 u.a. foram determinadas por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz, e por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo foram observadas micelas esféricas. A potencial zeta aniônico (de -0,139 a -0,613 mV) dos três sistemas foi determinada por meio do potencial zeta. Os efeitos fotodinâmicos do FS na micela fotoativada bem como em micelas convencionais e CUR livre em aPDT contra culturas planctônicas de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram diminuição de 1 Log<sub>10</sub> comparado com os respectivos grupos controle (diferença significativa  $p < 0,05$ ). Já em culturas planctônicas *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) a micela fotoativada demonstrou maior efeito fotodinâmico antimicrobiano que os sistemas convencionais diminuindo a contagem de colônias 2 Log<sub>10</sub> comparado com o grupo controle (diferença significativa  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, a aPDT promoveu diminuição da biomassa dos biofilmes de MRSA e *C. albicans*, comparados com seus respectivos grupos controle (diferença significativa  $p < 0,05$ ). Finalmente, as micelas foto-ativadas não apresentaram toxicidade em queratinócitos orais. Desta forma, a aPDT mediada pela CUR em micelas foto-ativadas pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções microbianas.

**Palavras-chave:** Fotoquimioterapia. Bactérias. Fungos. Luz.

Trigo Gutierrez, JK. Development, characterization, and photodynamic effects of Curcumin in light-triggered copolymer micellar system for antimicrobial Photodynamic Therapy [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## ABSTRACT

Nanocarriers have been used successfully for delivery of curcumin (CUR); however, slow release from nanosystems hinders its use as topical photosensitizer (PS) in antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), which requires long pre-irradiation times. Light-triggered nanosystems are an interesting option, since they allow remote temporal control of drug release. Thus, in this research a photo-responsive micelle (PRM) was synthesized to carry CUR. The PRM were synthesized by direct addition method using the photoresponsive polymer formed by poly (ethylene glycol), 3-nitro-4-bromobenzilic acid as chromophore and phenoxiacetic acid as apolar segment. Moreover, conventional micelles synthesized from commercial Pluronic® P123 and F127 as control micelles. The characterization of the micelles by fluorescence and absorbance spectroscopy were Critical Micellar Concentration, binding of PRM to CUR, and fluorescence quenching. The Entrapment Efficiency (EE%) was also higher in PRM (88.79%), on the other hand, a similar EE% were observed between F127 and P123 micelles (77.52 and 72.58% respectively). Furthermore, degradation of the absorption spectra of PRM was observed, allowing CUR being released from the PRM, thus the slow release from the nanosystem was improved. Dynamic light scattering, and Scanning Electronic Microscopy, showed the micelles size on the nanometric scale (40.42, 22.90, and 20.78 for PRM, F127 and P123 micelles, respectively), and high homogeneity of the systems (to 0.392). The Field Emission Scanning Electronic Microscopy showed spherical shape micelles. The zeta potential of the three systems were anionic (from -0.139 to -0.613 mV). The aPDT mediated CUR-loaded PRM as well as conventional micelles and free CUR against planktonic cultures of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida albicans*, and *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated. In *C. albicans*, and *P. aeruginosa* aPDT mediated by PRM, conventional micelles and free CUR promoted diminution of 1 Log in colony count compared with the control group ( $p < 0.05$ ). In MRSA the aPDT mediated by PRM promotes diminution of 2 Log compared to the control group ( $p < 0.05$ ). While in groups aPDT treated with conventional micelles and free CUR diminution of 1 Log compared with the control group was observed ( $p < 0.05$ ). Moreover, the aPDT mediated by CUR in PRM decreased the biomass in single biofilm of MRSA and *C. albicans* –significant difference of  $p < 0.05$  compared to their respective control groups. Furthermore, the PRM did not show toxic effect on Normal Oral Keratinocytes cells. Thus, PRM could be an alternative to treat microbial infections.

**Keywords:** Photochemotherapy. Bacteria. Fungi. Light.

## SUMÁRIO

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                              | <b>14</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>                                              | <b>19</b> |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                   | <b>20</b> |
| <b>3.1 CUR como FS .....</b>                                           | <b>20</b> |
| <b>3.2 Sistemas Nanoestruturados.....</b>                              | <b>27</b> |
| <b>3.3 Micelas Carregadas com CUR.....</b>                             | <b>28</b> |
| <b>3.4 Sistemas Fotoativados .....</b>                                 | <b>31</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>                                       | <b>34</b> |
| <b>4.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS) .....</b>               | <b>34</b> |
| <b>4.1.1 Reação do PEG<sub>1500</sub> com o ácido 3-nitro-4-</b>       |           |
| <b>bromometilbenzoico (PEG-ANB) .....</b>                              | <b>34</b> |
| <b>4.1.2 Reação do PEG-ANB com ácido fenoxiacético</b>                 |           |
| <b>(PEG-ANB-AFA) .....</b>                                             | <b>35</b> |
| <b>4.1.3 Espectro de Ressonância Magnética (NMR) do PFS .....</b>      | <b>36</b> |
| <b>4.2 Síntese e Caracterização das Micelas .....</b>                  | <b>36</b> |
| <b>4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>4.2.2 Determinação da constante de ligação (K<sub>b</sub>)</b>      |           |
| <b>do PFS à CUR .....</b>                                              | <b>37</b> |
| <b>4.2.3 Síntese das micelas .....</b>                                 | <b>38</b> |
| <b>4.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%) .....</b>                  | <b>38</b> |
| <b>4.2.5 Supressão da fluorescência .....</b>                          | <b>39</b> |
| <b>4.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão</b>          |           |
| <b>e potencial zeta .....</b>                                          | <b>40</b> |
| <b>4.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG) .....</b>         | <b>40</b> |
| <b>4.2.8 Fotodegradação do PFS .....</b>                               | <b>41</b> |
| <b>4.2.9 Fotoliberação da CUR .....</b>                                | <b>41</b> |
| <b>4.2.10 Liberação da CUR das micelas convencionais .....</b>         | <b>42</b> |
| <b>4.3 Avaliação Antimicrobiana Fotodinâmica das Formulações .....</b> | <b>43</b> |
| <b>4.3.1 Micro-organismos e condições de crescimento .....</b>         | <b>43</b> |

|                                                                                                  |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.3.2 aPDT em culturas planctônicas de<br><i>C. albicans</i> , SARM e <i>P. aeruginosa</i> ..... | 46     |
| 4.3.3 aPDT na biomassa de biofilme simples .....                                                 | 49     |
| 4.4 Ensaio de Citotoxicidade .....                                                               | 50     |
| 4.5 Análise Estatística .....                                                                    | 51     |
| <br>5 RESULTADO .....                                                                            | <br>52 |
| 5.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS) .....                                                | 52     |
| 5.2 Síntese e Caracterização das Micelas .....                                                   | 52     |
| 5.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) .....                                   | 52     |
| 5.2.2 Determinação da constante de ligação ( $K_b$ )<br>do PFS à CUR .....                       | 58     |
| 5.2.3 Síntese das micelas .....                                                                  | 60     |
| 5.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%) .....                                                   | 60     |
| 5.2.5 Supressão de fluorescência .....                                                           | 60     |
| 5.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão<br>e potencial zeta .....                 | 61     |
| 5.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG) .....                                          | 64     |
| 5.2.8 Fotodegradação do PFS .....                                                                | 65     |
| 5.2.9 Fotoliberação da CUR .....                                                                 | 66     |
| 5.2.10 Liberação das micelas convencionais .....                                                 | 66     |
| 5.3 Avaliação antimicrobiana Fotodinâmica das formulações.....                                   | 66     |
| 5.3.1 aPDT em culturas planctônicas de<br><i>C. albicans</i> , SARM e <i>P. aeruginosa</i> ..... | 66     |
| 5.3.2 aPDT na biomassa de biofilme simples .....                                                 | 69     |
| 5.4 Ensaio de Citotoxicidade.....                                                                | 71     |
| <br>6 DISCUSSÃO .....                                                                            | <br>73 |
| <br>7 CONCLUSÃO .....                                                                            | <br>81 |
| <br>REFERÊNCIAS .....                                                                            | <br>82 |
| <br>APÊNDICES .....                                                                              | <br>92 |

**ANEXO ..... 220**

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são considerados uma das formas de vida mais bem sucedidas na terra<sup>1</sup> e definidos como comunidades microbianas altamente organizadas, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, e protegida por uma matriz polimérica extracelular (MPE) produzida pelos próprios micro-organismos constituintes da comunidade<sup>2,3</sup>. Devido à interação das células microbianas e a presença da MPE, o biofilme possui propriedades diferentes dos micro-organismos que se encontram em forma livre ou planctônica<sup>1</sup>. Na forma de biofilme, os micro-organismos obtêm retenção de água e resistência a dessecação, captação e armazenamento de nutrientes, adesão ao sítio de infecção, proteção física contra o sistema de defesa do hospedeiro e os agentes antimicrobianos externos<sup>2,4</sup>, sendo necessárias maiores concentrações de antimicrobianos para promover a sua inativação<sup>5-7</sup>. Adicionalmente, o uso de antibióticos na indústria pecuária, o uso indiscriminado de antimicrobianos, entre outros fatores, têm contribuído com o surgimento de cepas microbianas resistentes às terapias medicamentosas convencionais<sup>8</sup>.

O desenvolvimento de cepas microbianas resistentes às terapêuticas convencionais tem levado à aparição das denominadas superbactérias<sup>9</sup>, uma delas é a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* que é considerada um dos micro-organismos mais perigosos para a saúde humana, devido a sua capacidade de evadir o sistema imune do hospedeiro e resistir às terapias antibióticas<sup>10</sup> (metilina), sendo denominado de *S. aureus* resistente à metilina (SARM) ou *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)<sup>10</sup>. MRSA tem sido associado a infecções fatais tanto em ambientes hospitalares quanto em comunidades, sendo que essa bactéria é responsável por 20% do total das infecções causadas por *S. aureus*<sup>9</sup>.

Em enfermidades, como fibrose cística e enfermidade obstrutiva crônica dos pulmões, foram identificadas colônias de MRSA associadas ao bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, e ambas bactérias são consideradas os maiores patógenos oportunistas associados a infecções hospitalares<sup>11</sup>. A fibrose cística aumenta a viscosidade das secreções e secreções digestivas, causando infecções recorrentes. Essas infecções acometem as vias respiratórias, principalmente os pulmões, e estão frequentemente associadas a biofilme de *P. aeruginosa*, o que diminui a função pulmonar e eleva as taxas de morbidade e mortalidade<sup>12</sup>. Apesar de antibióticos inalados serem mais efetivos no início da infecção, até o momento

não há consenso de qual estratégia antibiótica é a melhor para a erradicação da infecção<sup>13</sup>. Além disso, *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos antibióticos são responsáveis por 22% de pneumonias e 14,7% de infecções da corrente sanguínea<sup>14</sup>. As bactérias Gram-negativas resistentes a terapias medicamentosas convencionais são responsáveis por 29,3% das infecções da saúde humana<sup>15</sup>.

Além das bactérias acima mencionadas, outro micro-organismo altamente relacionado com infecções sistêmicas e hospitalares são os fungos do gênero *Candida*<sup>16</sup>, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente que vive como comensal em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis<sup>17</sup>. No entanto, pessoas com prolongados períodos usando antibióticos, pacientes imunosuprimidos, esse fungo se transforma em um patógeno oportunista<sup>18</sup>, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções (candidíase). *C. albicans* é um fungo polimórfico, apresentando-se como células leveduriformes (blastóporos) comensais até células filamentosas, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)<sup>18</sup>. Este polimorfismo celular representa uma transição para a patogenicidade das células de *C. albicans*, pois, na forma filamentar as barreiras imunológicas do hospedeiro podem ser superadas, favorecendo o aparecimento das infecções<sup>19</sup>. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção bucal pode se prolongar para o trato gastrointestinal ou para a corrente sanguínea, gerando um quadro de fungemia. A maioria dos casos de fungemia são provocados pelo gênero *Candida* (candidemia)<sup>20</sup>, e essa infecção sistêmica apresenta elevada taxa de mortalidade, é responsável por longos períodos de internação dos pacientes, além de ser uma das principais infecções nosocomiais<sup>20</sup>. Adicionalmente, o uso de antifúngicos tem levado também ao desenvolvimento de resistência de *C. albicans* e à emergência de espécies não-*albicans*, as quais apresentam menor susceptibilidade aos antifúngicos<sup>21</sup>.

Diante dos problemas com o uso dos antimicrobianos convencionais, terapias alternativas capazes de inibir o crescimento microbiano têm sido estudadas, como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)<sup>22,23</sup> que foi descoberta há mais de 100 anos a inativação de *Paramecia caudatum*<sup>24</sup>. O princípio da aPDT envolve um agente químico capaz de absorber luz, conhecido como fotossensibilizador (FS), uma luz de comprimento de onda adequado equivalente ao comprimento de onda de absorção do FS e oxigênio<sup>25</sup>. O FS absorve inicialmente a luz, o que excita o seu estado fundamental para o estado singleto de curta duração. O FS no estado

singleto pode retornar ao seu estado fundamental com a emissão de luz ou passar para o estado de tripleto. No estado tripleto, o FS pode retornar ao estado fundamental, com emissão de luz, ou reagir com moléculas vizinhas na presença de oxigênio molecular por meio de dois tipos de reações fotoquímicas (tipo I e tipo II)<sup>26,27</sup>.

Na reação tipo I, ocorre transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto e um substrato que, na presença de oxigênio, produz espécies reativas de oxigênio (EROS) como íons superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) e radicais hidroperoxila ( $HOO^{\cdot}$ ) que são tóxicos às células alvo. O fotoprocesso tipo II é um mecanismo de transferência de energia que envolve a troca de elétrons entre o estado de tripleto do FS e o oxigênio, que passa do seu estado molecular fundamental ( $^3O_2$ ) para o estado excitado singleto, capaz de reagir com moléculas biológicas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos<sup>27,28</sup>. Assim o mecanismo de inativação da aPDT baseia-se no efeito oxidativo das estruturas microbianas após aplicação do FS e iluminação<sup>29</sup>. Recentemente, tem-se proposto também a reação do tipo III, com formação de radicais livres na ausência de oxigênio<sup>25</sup>.

Alguns FS utilizados com sucesso contra micro-organismos incluem porfirinas, clorinas, ftalocianinas e compostos naturais como a curcumina (CUR)<sup>26,30</sup>. CUR é um polifenol (diferuloylmetano) derivado da *Curcuma longa* L, presente no açafrão e com propriedades terapêuticas anticancerígenas, antioxidante, anti-inflamatórias e antimicrobianas inatas<sup>31</sup>. Estudos *in vitro*<sup>32-34</sup> e *in vivo*<sup>35</sup> tem demonstrado a eficácia da CUR como FS usando luz azul<sup>32-35</sup>. No entanto, a natureza hidrofóbica, instabilidade e baixa biodisponibilidade da CUR<sup>36</sup> limitam sua aplicabilidade clínica, uma vez que, para sua diluição, são necessários solventes orgânicos, tais como dimetil-sulfóxido, que em concentrações elevadas apresenta toxicidade celular<sup>37,38</sup>.

Uma alternativa para veicular substâncias hidrofóbicas como a CUR consiste na utilização de sistemas de liberação de fármacos, tais como: nanopartículas sólidas de lipídeo, ciclodextrinas, partículas poliméricas, micelas poliméricas, entre outros<sup>39</sup>. Alguns desses sistemas de liberação foram usadas com sucesso para entrega de CUR contra micro-organismos<sup>40-43</sup>. Os nanosistemas permitem a veiculação da CUR em sistemas aquosos, compatíveis para uso clínico, além de protegerem a molécula até esta alcançar o tecido alvo para tratamento, o que

melhora a estabilidade química da substância e sua biodisponibilidade, além de permitir a liberação sustentada da substância<sup>44</sup>.

Dentre essas nanoformulações, micelas poliméricas representam um sistema de liberação de fármacos com vantagens, tais como partículas de tamanho pequeno, direcionamento para alvos específicos, além de melhorar a solubilidade de drogas hidrofóbicas<sup>44</sup>. O poli (etileno-glicol) (PEG) é amplamente usado para síntese de micelas, uma vez que, por ser um polímero não iônico, reduz a agregação das formulações e produz, assim, sistemas de liberação de fármacos com maior estabilidade durante o armazenamento e aplicação<sup>45</sup>. Portanto, CUR em micelas copoliméricas de PEG podem ser um sistema promissor contra micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais.

Apesar das pesquisas com nanoformulações serem promissoras para veiculação de fármacos hidrofóbicos, poucas dessas pesquisas são direcionadas à fotoinativação microbiana<sup>38,47,48</sup>, possivelmente devido à demorada liberação dos fármacos desses sistemas, o que conseqüentemente dificulta sua aplicação em aPDT<sup>49</sup>. Isso ocorre porque há a necessidade de um longo período de pré-irradiação para que o FS seja liberado do sistema e fotosensibilize as células alvo.

As nanoformulações estímulo responsivas representam uma alternativa para melhorar a liberação de fármacos dos nanosistemas, pois permitem que o nanosistema alcance o tecido alvo, onde ocorre a liberação do fármaco por meio de um estímulo externo, como luz, ultrassom, pH, calor, entre outros<sup>50,51</sup>. Nas formulações fotoativadas, são adicionados iniciantes (cromóforos, como azobenzeno, cumarina ou o-nitrobenzil) que coadjuvam para que a liberação seja mais rápida<sup>50</sup>. Dentre os mecanismos de liberação por luz, podem ser mencionadas a fotoisomerização, quebra de ligações cruzadas, a oxidação induzida por fotossensibilização, a absorção plasmônica de superfície, a mudança de hidrofobicidade fotoquímica<sup>50,51</sup>.

Os derivados de nitrobenzil (NB) são cromóforos que ganharam atenção considerável como conectores de fotoclivagem tanto para hidrogéis<sup>52</sup> quanto para copolímeros em bloco<sup>53</sup>. Pois, podem ser facilmente conjugados com polímeros e biomoléculas as quais apresentam certa estabilidade em condições fisiológicas e podem ser degradados rapidamente por meio da foto-clivagem<sup>54</sup>. No entanto, ao nosso conhecimento, não existem relatos nos quais os compostos PEG e NB tenham sido utilizados para veiculação de CUR.

Embora existam relatos de fotoinativação microbiana com nanopartículas ativadas por luz<sup>55,56</sup>, a maioria desses estudos empregaram culturas planctônicas. Como os biofilmes possuem maior resistência às terapias antimicrobianas, a pesquisa de nanoformulações ativadas por luz aplicadas a aPDT contra biofilmes microbianos torna-se um desafio importante. A ativação de nanoformulações por luz para liberação do FS é bastante interessante para uma aplicação tópica da aPDT, pois permite reduzir o tempo de incubação da nanoformulação no local da infecção ou contaminação, além de um controle remoto-temporal para liberação do FS.

## 7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desta pesquisa pode se concluir:

O sistema micelar foto-ativado facilitou a liberação de CUR, adicionalmente foi observada fotoinativação microbiana em culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, SARM e *C. albicans*;

O polímero fotossensível desenvolvido sofreu fotodegradação com irradiação UV e foi capaz de formar micelas com tamanho nanométrico, baixo IPD e potencial zeta aniônico;

A aPDT mediada pela CUR em micelas foto-ativadas, apresentou efetividade na diminuição de UFC/mL em culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, SARM e *C. albicans*;

A aPDT promoveu diminuição da biomassa dos biofilmes de MRSA e *C. albicans*;

O sistema fotoinduzido não apresentou citotoxicidade em queratinócitos.

## REFERÊNCIAS\*

1. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
2. Fimble A, Lynch S, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 415-28.
3. Seneviratne G, Zavahir JS, Bandara WMMS, Weerasekara MLMA. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24: 739.
4. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms.* 2017; 5(2): pii E15.
5. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res.* 2000; (34): 260–67.
6. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8.
7. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1771-6.
8. WHO- World Health Organization {homepage na internet}. 10 facts on antimicrobial resistance. Disponível em: [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial\\_resistance/en/#](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/#).
9. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2016; 7: 287-312.
10. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(5): 344-9.
11. Kaye KS, Pogue JM. Infections caused by resistant Gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy.* 2015; 35(10): 949-62.
12. Moore JE, Mastoridis P. Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther.* 2017; 42(3): 259-67.
13. Langton H, Hoyer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 4: CD004197.
14. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 109-15.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Keith S, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(10): 949-62.
16. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(9): a019778.
17. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*. 2017; 122(2): 321-30.
18. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7.
19. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2): 213-67.
20. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016; 34: 21-8.
21. Kontoyiannis DP. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and a Global Challenge. *J Infect Dis*. 2017; 216(3): S431-5.
22. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 67-73.
23. Hamblin MR, Abrahamse H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(2): pii:E53.
24. Raab O, U"ber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infus- orien. *Zeit Biol*. 1900; 39: 524-46.
25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3(5): 436-450.
26. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1704(2): 59-86
27. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011; 55(1): 143-66.
28. Yin R, Agrawal T, Khan U, Gupta GK, Rai V, Huang YY, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (Lond)*. 2015; 10(15): 2379-404.
29. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014; 5: 405.
30. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016; 473(4): 347-64.
31. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and health. *Molecules*. 2016; 21(3): 264.

32. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895-903.
33. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
34. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(5): 997-1009.
35. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013; 51(3): 243-51.
36. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. 2014; 19(12): 20091–112.
37. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis*. 2009; 34(1): 1-10.
38. Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One*. 2017; 12(11): e0187418.
39. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014; 35(10): 3365-83.
40. Chen J, He ZM, Wang FL, Zhang ZS, Liu XZ, Zhai DD, et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *Eur J Pharmacol*. 2016; 772: 33-42.
41. Arunraj TR, Rejinold NS, Mangalathillam S, Saroj S, Biswas R, Jayakumar R. Synthesis, characterization and biological activities of curcumin nanospheres. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; 10(2): 238-50.
42. Hazzah HA, Farid RM, Nasra M, Hazzah WA, El-Massik MA, Abdallah OY. Gelucire-based nanoparticles for curcumin targeting to oral mucosa: preparation, characterization, and antimicrobial activity assessment. *J Pharm Sci*. 2015; 104(11): 3913-24.
43. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine*. 2015; 11(1): 195-206.
44. Ansari SH, Islam F, Sameem M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. *J Adv Pharm Technol Res*. 2012; 3(3): 142–6. doi: 10.4103/2231-4040.101006.
45. Song Z, Zhu W, Liu N, Yang F, Feng R. Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. *Int J Pharm*. 2014; 471(1): 312-21.

46. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010; 49(36): 6288–308.
47. Baltazar LM, Krausz AE, Souza ACO, Adler BL, Landriscina A, Musaev T, et al. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. *PloS One.* 2015; 10(3): e0120179.
48. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin—effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47(1): 65-74.
49. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, Mima EGO. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules.* 2018; 23(8): 2075. doi: 10.3390/molecules23082075.
50. Fomina N, Sankaranarayanan J, Almutairi A. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(11): 1005-20.
51. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Baghaee-Ravari S, Ghazadeh M, Mirshekari H, Hamblin MR. Smart nanostructures for cargo delivery: uncaging and activating by light. *J Am Chem Soc.* 2017; 139(13): 4584-610.
52. Ejaz M, Yu H, Yan Y, Blake DA, Ayyala RS, Grayson SM. Evaluation of redox-responsive disulfide cross-linked poly (hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Polymer.* 2011; 52(23): 5262-70.
53. Anilkumar P, Gravel E, Theodorou I, Gombert K, Thézé B, Ducongé F, et al. Nanometric Micelles with Photo-Triggered Cytotoxicity. *Adv Funct Mater.* 2014; 24: 5246–52.
54. Shen W, Zheng J, Zhou Z, Zhang D. Approaches for the synthesis of o-nitrobenzyl and coumarin linkers for use in photocleavable biomaterials and bioconjugates and their biomedical applications. *Acta Biomater.* 2020; 1(115): 75-91. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.024.
55. Ye Y, Li Y, Fang F. Upconversion nanoparticles conjugated with curcumin as a photosensitizer to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lung under near infrared light. *Int J Nanomedicine.* 2014; 6(9): 5157-65.
56. Liu J, Yu M, Zeng G, Cao J, Wang Y, Ding T, Yang X, et al. Dual antibacterial behavior of a curcumin-upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. *J Mater Chem B.* 2018; 6(47): 7854-61. doi: 10.1039/c8tb02493f.
57. Freitas MAA, Pereira AHC, Pinto JG, Casas A, Ferreira-Strixino J. Bacterial viability after antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2019; 14: 739-48. doi: 10.2217/fmb-2019-0042.

58. Teixeira CGS, Sanitá PV, Ribeiro APD, Dias LM, Jorge JH, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy effectiveness against susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30: 101760. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101760.
59. Fournier JM, Boutonnier A, Bouvet A. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1372–4.
60. Araújo TSD, Rodrigues PLF, Santos MS, Oliveira Jm, Rosa LP, Bagnato VS, et al. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 219-23.
61. Penha CB, Bonin E, Silva AF, Hioka N, Zangueta EB, Nakamura TU, et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. *LWT - Food Sci Tech.* 2017; 76: 198-202.
62. Khoobi M, Masoule SF, Pourhajibagher M, Safari J. Photodynamic Inactivation of Endopathogenic Microbiota Using Curcumin- mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J Sci, Islamic Republic of Iran.* 2018; 29(3): 205 - 9.
63. Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30: 101645. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101645.
64. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013;58(2): 200-10. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.10.011.
65. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27: 280-7.
66. Oliveira EF, Tosati JV, Tikekar RV, Monteiro AR, Nitin N. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. *Postharvest Biol Tech.* 2018; 137: 86-94.
67. Agel MR, Baghdan E, Pinnapireddy SR, Lehmann J, Schäfer J, Bakowsky U. Curcumin loaded nanoparticles as efficient photoactive formulations against gram-positive and gram-negative bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 178(1): 460-8.
68. Preis E, Baghdan E, Agel MR, Anders T, Poursghar M, Schneider M, et al. Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 142: 531-9.
69. Rocha MP, Ruela ALM, Rosa LP, Santos GPO, Rosa FCS. Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 17: 101962. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101962

70. Rupel K, Zupin L, Brich S, Mardirossian M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Antimicrobial activity of amphiphilic nanomicelles loaded with curcumin against *Pseudomonas aeruginosa* alone and activated by blue laser light. *J Biophotonics*. 2020; 5. doi: 10.1002/jbio.202000350.
71. Pourhajibagher M, Plotino G, Chiniforush N, Bahador A. Dual wavelength irradiation antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and metformin doped with nano-curcumin as an efficient adjunctive endodontic treatment modality. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101628.
72. Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. (2010). Cyclodextrins for drug delivery. *J Drug Target*. 2010; 18(9): 645–656. doi:10.3109/10611861003622552.
73. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol*. 2015; 6. doi:10.3389/fphar.2015.00286.
74. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B*. 2010; 75(1): 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.00.
75. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *J Control Release*. 2005; 109: 169–88.
76. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi KC, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm*. 2017; 532: 249–68.
77. Miyata K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *React Func Pol*. 2011; 71: 227–34.
78. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability, *Nano today*. 2012; 7: 53–65.
79. Alexandridis P, Holzwarth JF, and Hatton TA. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromol*, 1994; 27: 2414-25.
80. Andrew M Bodratti, Paschalis Alexandridis, Formulation of Poloxamers for Drug Delivery, *J Funct Biomater*. 2018; 9(1):11. doi: 10.3390/jfb9010011
81. Vaidya FU, Sharma R, Shaikh S, Ray D, Aswal VK, Pathak C. Pluronic micelles encapsulated curcumin manifests apoptotic cell death and inhibits pro-inflammatory cytokines in human breast adenocarcinoma cells, *Cancer Rep (Hoboken)*. 2019; 2(1): e1133. doi: 10.1002/cnr2.1133.
82. Sahu A, Kasoju N, Goswami P, Bora U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications, *J Biomater Appl*. 2011; 25(6): 619-39.
83. Ganguly R, Kunwar A, Dutta B, Kumar S, Barick KC, Ballal A, et al. Heat-induced solubilization of curcumin in kinetically stable pluronic P123 micelles and vesicles: An exploit of slow dynamics of the micellar restructuring processes in the aqueous pluronic system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017; 152(1): 176-82.

84. Akbar MU, Zia KM, Akash MSH, Nazir A, Zuber M, Ibrahim M. In-vivo anti-diabetic and wound healing potential of chitosan/alginate/maltodextrin/pluronic-based mixed polymeric micelles: Curcumin therapeutic potential. *Int J Biol Macromol*. 2018; 120: 2418-30.
85. Sun Y, Li Y, Shen Y, Wang J, Tang J, Zhao Z. Enhanced oral delivery and anti-gastroesophageal reflux activity of curcumin by binary mixed micelles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019; 45(9): 1444-50. doi: 10.1080/03639045.2019.1628041.
86. Peng S, Hung WL, Peng YS, Chu IM. Oligoalanine-modified Pluronic-F127 nanocarriers for the delivery of curcumin with enhanced entrapment efficiency. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014; 25(12): 1225-39. doi: 10.1080/09205063.2014.924059.
87. Raveendran R, Bhuvaneshwar GS, Sharma CP. In vitro cytotoxicity and cellular uptake of curcumin-loaded Pluronic/Polycaprolactone micelles in colorectal adenocarcinoma cells. *J Biomater Appl*. 2013; 27(7): 811-27. doi: 10.1177/0885328211427473.
88. Duan Y, Cai X, Du H, Zhai G. Novel in situ gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 128(1): 322-30.
89. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 316–7
90. Kumar S, Allard JF, Morris D, Dory YL, Lepage M, Zhao Y. Near-infrared light sensitive polypeptide block copolymer micelles for drug delivery. *J Mat Chem*. 2012; 22(15): 7252-57.
91. Liu Y, An X. Preparation, microstructure and function of liposome with light responsive Switch. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 178: 238–44.
92. Zhang Z, Wang R, Huang X, Luo R, Xue J, Gao J, et al. Self-Delivered and Self-Monitored Chemo-Photodynamic Nanoparticles with Light-Triggered Synergistic Antitumor Therapies by Downregulation of HIF-1 $\alpha$  and Depletion of GSH. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020; 12: 5680–94.
93. Hernández-Montoto A, Montes R, Samadi A, Gorbe M, Terrés JM, Cao-Milán R, Aznar E, et al. Gold Nanostars Coated with Mesoporous Silica Are Effective and Nontoxic Photothermal Agents Capable of Gate Keeping and Laser-Induced Drug Release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018; 10(33): 27644-56.
94. Singh SP, Alvi SB, Pemmaraju DB, Singh AD, Manda SV, Srivastava R, et al. NIR triggered liposome gold nanoparticles entrapping curcumin asin situ adjuvant for photothermal treatment of skin cancer. *Int J Biol Macromol*. 2018; 110: 375–82.
95. Chen C, Liu G, Liu X, Pang S, Zhu C, Liping L, et al. Photo-responsive, biocompatible polymeric micelles self-assembled from hyperbranched polyphosphate-based polymers. *Polym Chem*. 2011; 2: 1389.
96. Anilkumar P, Gravel E, Theodorou I, Gombert K, Thézé B, Ducongé F. Nanometric Micelles with Photo-Triggered Cytotoxicity. *Adv Mat*. 2014; 24(33): 5246-52

97. Bin Wang, Kefu Chen, Rendang Yang, Fei Yang, Jin Liu. Stimulus-responsive polymeric micelles for the light-triggered release of drugs, *Carbohydr Polym.* 2014; (103) 510–9.
98. Liu X, He J, Niu Y, Li Y, Hu D, Xia X, et al. Photo-responsive amphiphilic poly( $\alpha$ -hydroxy acids) with pendent o-nitrobenzyl ester constructed via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Pol Adv Tech.* 2015; 26(5): 449-456.
99. Ye Z, Guo J, Wu D, Tan M, Xiong X, Yin Y, et al. Photo-responsive shell cross-linked micelles based on carboxymethyl chitosan and their application in controlled release of pesticide. *Carbohydr Polym.* 2015; 132(5): 520-528.
100. Ding K, Shi L, Zhang L, Zeng T, Yin Y and Yi Y. Synthesis of photoresponsive polymeric propesticide micelles based on PEG for the controlled release of a herbicide. *Polym Chem.* 2016; 7: 899-904.
101. Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1978; 17: 522-4.
102. Hirose K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants, *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2001; 39: 193.
103. Boruah B, Saikia PM, Dutta RK. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan–surfactant systems: A spectroscopic study. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2012; 245:18-27.
104. Calori IR, Tedesco AC. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2016; 160: 240-7.
105. Dominguez A, Fernandez A, Gonzalez N, Iglesias E, Montenegro L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J Chem Educ.* 1997; 74(10): 1227.
106. Christine A, Dusica M, Adi E. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1999; 16:3–27.
107. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm.* 2017; 532:249-68.
108. Akbar MU, Zia KM, Nazir A, Iqbal J, Ejaz SA, Akash MSH. Pluronic-Based Mixed Polymeric Micelles Enhance the Therapeutic Potential of Curcumin. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(6): 2719-39.
109. Patil S, Choudhary B, Rathore A, Roy K, Mahadik K. Enhanced oral bioavailability and anticancer activity of novel curcumin loaded mixed micelles in human lung cancer cells. *Phytomedicine.* 2015; 22: 1103–11.
110. Kunwar A, Barik A, Priyadarsini KI, Pandey R. Absorption and fluorescence studies of curcumin bound to liposome and living cells. *BARC newsletter,* 2007; 285: 213-9.
111. Iwunze MO. Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. *J Mol Liq.* 2004; 111: 161–5.

112. Wang L, He D, Wang S, Dai Y, Ju J, Zhao C. Preparation and evaluation of curcumin-loaded self-assembled micelles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018; 44(4): 563–9.
113. Saxena V, Hussain MD. Polymeric Mixed Micelles for Delivery of Curcumin to Multidrug Resistant Ovarian Cancer. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9: 1146–54.
114. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 69: 1–9.
115. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani FH, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018; 10(2): 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
116. Ma Z, Haddadi A, Molavi O, Lavasanifar A, Lai R, Samuel J. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 86(2): 300–10.
117. Holmes PC, Jones DG. Reagents for Combinatorial Organic Synthesis: Development of a New *o*-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Synthesis. *J Org Chem*. 1995; 60: 2318–9.
118. Tosati JV, de Oliveira EF, Oliveira JV, Nitin N, Monteiro AR. Light-activated antimicrobial activity of turmeric residue edible coatings against cross-contamination of *Listeria innocua* on sausages. *Food Control*. 2018; (84): 177–85.
119. Winter S, Tortik N, Kubin A, Krammer B, Plaetzer K. Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12(10): 1795–802. doi: 10.1039/c3pp50095k.
120. Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A. Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut(2)- Arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacol Res*. 2001; 44: 243–6.
121. Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T, Berneburg M, Plaetzer K. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 840417.
122. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008; 53: 61–109.
123. Rosa LP, da Silva FC. Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections. *J Med Microb Diagn*. 2014; 3: p. 158, 10.4172/2161-0703.1000158.

124. Batista de Andrade Neto J, Pessoa de Farias Cabral V, Brito Nogueira LF, Rocha da Silva C, Gurgel do Amaral Valente Sá L, Ramos da Silva A, et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. *Microb Pathog.* 2021; 155:104892. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104892.
125. Akhtar F, Khan AU. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Against Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) Biofilm Disruption: A Putative Role of Phagocytosis in Infection Control. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 36: 102552. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102552
126. Rajasekar V, Darne P, Prabhune A, Kao RYT, Solomon AP, Ramage G, et al. A Curcumin-sophorolipid Nanocomplex Inhibits *Candida albicans* Filamentation and Biofilm Development. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021; 200: 111617. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111617.
127. Ghasemi M, Khorsandi K, Kianmehr Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(9):149. doi: 10.1007/s11274-021-03104-4.