



**UNESP** - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara*

**Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidose bucal**

Jéssica Bernegossi

**Orientador:** Prof. Dr. Marlus Chorilli

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

Araraquara/SP

2018



**UNESP** - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara*

**Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidose bucal**

Jéssica Bernegossi

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Dra. em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Marlus Chorilli

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

Araraquara/SP

2018

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**B525s**

Bernegossi, Jéssica

Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidose bucal / Jéssica Bernegossi. – Araraquara, 2018.  
139 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.  
Coorientadora: Lívia Nordi Dovigo.

1. Sistemas precursores de cristais líquidos. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Curcumina.  
4. Candidose bucal. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Dovigo, Lívia Nordi, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1. Sistemas de cristais líquidos e precursores .....	25
2.2. Candidose bucal .....	31
2.3. Fototerapia e curcumina.....	33
3. OBJETIVOS .....	40
3.1. Objetivo Geral .....	40
3.2. Objetivos Específicos .....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.1. Material .....	41
4.1.1. Matérias-primas, reagentes e soluções.....	41
4.1.2. Instrumentos .....	42
4.1.3. Equipamentos .....	43
4.2. Métodos .....	44
4.2.1. Desenvolvimento de sistemas precursores de cristais líquidos .....	44
4.2.2. Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP) .....	46
4.2.3. Seleção dos sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) .....	46
4.2.4. Incorporação da curcumina nos sistemas selecionados .....	47
4.2.5. Caracterização físico-química dos sistemas .....	47
4.2.6. Fotodegradação da curcumina por UV.....	53
4.2.7. Testes microbiológicos <i>in vitro</i> .....	54
4.2.8. Testes microbiológicos <i>in vivo</i> .....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1. Caracterização físico-química .....	68
5.1.1. Microscopia de luz polarizada .....	68
5.1.2. Diagrama de fases ternário após caracterização por MLP.....	70
5.1.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	76
5.1.4. Análise reológica contínua .....	81
5.1.5. Força de mucoadesão <i>in vitro</i> .....	85
5.2. Método analítico para quantificação da curcumina .....	87

5.3. Teste de liberação <i>in vitro</i> .....	88
5.4. Permeação e retenção em mucosa de esôfagos suínos.....	93
5.5. Fotodegradação da curcumina.....	95
5.6. Avaliação biológica <i>in vitro</i> .....	100
5.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	100
5.6.1. Resultados da avaliação da curcumina incorporada em SPCL frente ao biofilme de <i>Candida albicans</i> .....	103
5.6.2. Quantificação de atividade metabólica (XTT).....	105
5.6.4. Viabilidade celular de queratinócitos por intermédio de Alamar Blue.....	108
5.7. Testes microbiológicos <i>in vivo</i> .....	110
6. CONCLUSÃO.....	121
7. REFERÊNCIAS.....	124
8. ANEXOS .....	139
8.1. Anexo I – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	139

## Resumo

A candidose bucal é causada principalmente pela levedura oportunista *Candida albicans*. O tratamento envolve a administração de antifúngicos de uso tópico ou sistêmico, para os quais se tem observado casos de resistência. Pesquisadores estão buscando métodos alternativos, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana e a descoberta de substâncias de origem natural que possam apresentar interesse terapêutico no tratamento da candidose bucal, como a curcumina, cuja ação antifúngica pode ser potencializada pelo emprego da luz, uma vez que atua também como fotossensibilizador. Todavia, esse fármaco apresenta características físico-químicas limitantes, como baixa solubilidade aquosa. Logo, sua incorporação em sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) acrescidos de polímeros mucoadesivos demonstra ser uma opção interessante para viabilizar o seu uso. O trabalho objetiva a avaliação de SPCL mucoadesivos para administração bucal de curcumina, bem como verificar o efeito do tratamento da candidose bucal com o uso da terapia fotodinâmica, empregando estudos *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram desenvolvidos SPCL compostos de ácido oleico, álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS) e dispersão polimérica de poloxamer (16%) e/ou polietilenoimina (0,5%), capazes de incorporar a curcumina, os quais foram caracterizados empregando microscopia de luz polarizada (MLP), reologia, espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) e mucoadesão *in vitro*, antes e após a diluição com saliva artificial. Foram realizados estudos de liberação *in vitro*, permeação e retenção *ex vivo*, além de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* para a avaliação da curcumina incorporada em SPCL frente a *Candida albicans*. Na MLP, foi possível a visualização da transição dos SPCL, caracterizado como campo escuro, para mesofases hexagonais e lamelares, características de sistemas líquido-cristalinos. Os resultados reológicos evidenciaram que os sistemas obtidos apresentaram-se inicialmente como Newtonianos e após a adição da saliva artificial mostraram-se como não Newtonianos, pseudoplásticos. Os resultados de SAXS corroboraram com os resultados de MLP. No ensaio de mucoadesão *in vitro* foi observado que houve maior força de atração entre a mucosa e a formulação nas amostras que continham a união dos dois polímeros e após a adição da saliva artificial. No ensaio de liberação *in vitro* foi observado que os sistemas modificaram o perfil de liberação da curcumina quando comparado com o fármaco em solução. No ensaio de permeação *ex vivo* foi observado que os sistemas não foram capazes de permearem a membrana esofágica; contudo, quantidade significativa de curcumina foi detectada no ensaio de retenção. No ensaio de viabilidade celular evidenciaram que após 24h do SPCL em contato com as células testadas, estas ainda apresentaram 75% de células viáveis quando comparado ao controle de células vivas. O ensaio *in vivo* mostrou que após 24h de tratamento não houve efeito antimicrobiano em relação ao controle positivo. Contudo, os dados obtidos

dos animais analisados após 7 dias do último tratamento, mostram promitentes, uma vez que em alguns dos animais não tiveram crescimento de colônias no grupo PP-CUR-PDT. Na análise histológica dos animais analisados após 24h do último tratamento, foi observada a presença de pseudo-hifas de *Candida albicans* no tecido epitelial dos animais tratados apenas PP-CUR sem irradiação de luz; todavia, os animais tratados com a formulação de curcumina em associação a luz não apresentaram a levedura segundo análise histológica. Logo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os sistemas desenvolvidos e caracterizados apresentaram características almejadas no tratamento da candidose bucal, de modo a facilitar a aplicação e permanência na mucosa da boca, sendo também capaz de controlar a liberação da curcumina.

**Palavras-chave:** sistemas precursores de cristais líquidos; terapia fotodinâmica; curcumina; candidose bucal.

## Abstract

Oral candidiasis is caused mainly by the opportunistic yeast *Candida albicans*. Treatment involves the administration of topical or systemic antifungal for which resistance has been observed. Researchers are looking for alternative methods, such as photodynamic therapy and the discovery of substances of natural origin that may be of therapeutic interest in the treatment of oral candidiasis, such as curcumin, whose antifungal action may be enhanced by the use of light, it also acts as a photosensitizer. However, this drug has limiting physical-chemical characteristics, such as low aqueous solubility. Therefore, its incorporation in liquid crystal precursor systems (LCPS) plus mucoadhesive polymers proves to be an interesting option to make its use feasible. The objective of this study is to evaluate the LCPS mucoadhesive for buccal administration of curcumin, as well as to verify the effect of oral candidosis treatment with the use of photodynamic therapy, using *in vitro* and *in vivo* studies. For this, LCPS compounds of oleic acid, ethoxylated and propoxylated cetyl alcohol (Procetyl<sup>®</sup> AWS) and polymer dispersion of poloxamer (16%) and/ or polyethyleneimine (0.5%), capable of incorporating curcumin, were developed. The compounds were characterized by using polarized light microscopy (PLM), rheology, scattering small angle X-ray scattering (SAXS) and mucoadhesion *in vitro*, before and after dilution with artificial saliva. *In vitro* release, permeation and retention *ex vivo* studies were carried out, as well as *in vitro* and *in vivo* biological assays for the evaluation of curcumin incorporated in LCPS versus *Candida albicans*. In PLM, it was possible to visualize the transition of LCPS, characterized as dark field, for hexagonal and lamellar mesophases, characteristics of liquid-crystalline systems. The rheological results evidenced that the systems obtained were initially Newtonian and after the addition of the artificial saliva were shown as non-Newtonian, pseudoplastic. SAXS results corroborated the results of PLM. In the *in vitro* mucoadhesion assay it was observed that there was greater force of attraction between the mucosa and the formulation in the samples that contained the union of the two polymers and after the addition of the artificial saliva. In the *in vitro* release assay it was observed that the systems modified the release profile of curcumin as compared to the drug in solution. In the *ex vivo* permeation assay it was observed that the systems were not able to permeate the esophageal membrane; however, significant amount of curcumin was detected in the retention assay. In the cell viability assay they showed that after 24 hours of the LCPS in contact with the tested cells, they still presented 75% of viable cells when compared to the control of living cells. The *in vivo* assay showed that after 24 hours of treatment there was no antimicrobial effect in relation to the positive control. However, data obtained in the animals analyzed after 7 days are promising, since complete killing was observed in some animals from the PP-CUR-PDT group. The histological images revealed presence of *Candida albicans* pseudo-hyphae in the epithelial tissue of the

animals treated with PP-CUR in the absence of light irradiation. However, animals treated with the curcumin formulation in association with light did not present indicatives of yeast. Therefore, the results obtained in this work suggest that the developed and characterized systems presented characteristics desired in the treatment of oral candidosis, in order to facilitate the application and permanence in the mucosa of the mouth, being also able to control the release of curcumin.

**Keywords:** liquid crystal precursor systems; photodynamic therapy; curcumin; oral candidiasis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação organizacional das mesofases cúbica, hexagonal e lamelar e suas respectivas estruturas microscópicas, campo escuro, cruces de malta e estrias.....	26
Figura 2 – Instrução para interpretação de um diagrama de fases ternário. A constituição para o ponto em destaque corresponde a 10 % de X (m/m), 10 % de Y (m/m) e 80 % de Z (m/m).....	45
Figura 3 - Foto do preparo das mucosas esofágicas. ....	49
Figura 4 - Imagem de uma célula de <i>Franz</i> no preparo para o ensaio de permeação e retenção. ....	51
Figura 5 - Foto da preparação das membranas esofágicas no teste de retenção.....	52
Figura 6 - Esquema dos procedimentos realizados para obtenção do pré-inóculo e inóculo.....	56
Figura 7 - Imagem do dispositivo Transwell® para inserção das amostras em contato com as células cultivadas em placa de 24 poços. ....	60
Figura 8 – Esquema cronológico dos procedimentos de inoculação, imunossupressão, tratamentos, recuperação com posterior plaqueamento das células de <i>Candida albicans</i> inoculadas nas línguas dos animais e eutanásia, do experimento realizado em camundongos <i>Swiss mice</i> .....	65
Figura 9 - Fotomicrografias dos sistemas PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PP-0%, PP-30%, PP-50% e PP-100% sob microscópio de luz polarizada. ....	69
Figura 10 - Diagramas de fases ternário A, B e C, classificados segundo microscopia de luz polarizada onde: cristal líquido (CL), emulsão (EM), microemulsão (ME) e separação de fases (SF). ....	71
Figura 11 - Imagens dos sistemas e suas respectivas diluições com saliva artificial sem curcumina; onde: A) PEI-0%, PEI-30%, PEI-50% e PEI-100%, B) PLU-0%, PLU-30%, PLU-50% e PLU-100% e C) PP-0%, PP-30%, PP-50% e PP-100%. ..	75
Figura 12 - Curvas de SAXS das formulações A) PEI, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, B) PLU, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100% e C) PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% (n= 3).....	77
Figura 13 - Reogramas das amostras: A) PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, B) PEI-CUR-0%, PEI-CUR-30%, PEI-CUR-50%, PEI-CUR-100%, C) PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100% D) PLU-CUR, PLU-CUR-30%, PLU-CUR-50%, PLU-CUR-100%, E) PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% e F) PP-CUR-0%, PP-CUR-30%, PP-CUR-50% e PP-CUR-100%. Os símbolos fechados representam as curvas ascendentes e os abertos, as curvas descendentes.....	82
Figura 14 - Força de mucoadesão (N) <i>in vitro</i> dos SPCL PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PP-0%, PP-30% PP-50%, PP-100% (n= 10).....	85

Figura 15 - Curva analítica da curcumina, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (r) obtidos por meio do método de CLAE (n= 3). .....	88
Figura 16 - Perfil de liberação de curcumina em sistemas precursores de cristais líquidos após 24 horas de análises, das amostras PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50% e em solução receptora, CUR livre (n= 3). .....	89
Figura 17 - Porcentagem de curcumina retida em mucosas suínas utilizadas durante o ensaio de liberação <i>ex vivo</i> (n= 6).....	94
Figura 18 - Espectros de absorbância ótica de DMSO, PEI, PLU e PP, com e sem curcumina 80 µM, degradado com LED em 450 nm em 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 e 30 minutos. Intensidade de 33,58 mW/cm <sup>2</sup> . Dose de irradiação variando de 0-60 J/cm <sup>2</sup> . Onde, A) DMSO, B) Solução de curcumina em DMSO, C) PEI, D) PEI-CUR E) PLU, F) PLU-CUR, G) PP e H) PP-CUR (n= 3).....	95
Figura 19 - Espectros de intensidade de fluorescência de DMSO, PEI, PLU e PP, com e sem da Curcumina 80 µM, degradado com LED em 450 nm em 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 e 30 minutos. Intensidade de 33,58 mW/cm <sup>2</sup> . Dose de irradiação variando de 0-60 J/cm <sup>2</sup> .....	99
Figura 20 - Médias e desvio-padrão dos valores de concentração mínima inibitória segundo o tratamento, com e sem a aplicação de luz, obtidos em oito dias diferentes (n=24). .....	100
Figura 21 - Médias e desvio-padrão dos valores de viabilidade de células Hacat segundo o reagente Alamar Blue em dois diferentes tempos de incubação com as amostras testadas, 24 e 48h. ....	108
Figura 22 - Imagens das línguas de camundongos fêmeas. A: língua de animal saudável. B e C: Manchas brancas ou pseudomembrana presentes no dorso da língua dos animais infectados com <i>Candida albicans</i> e não tratadas .....	110
Figura 23 - Médias e desvio-padrão dos valores de log <sub>10</sub> UFC/mL segundo a recuperação realizada em animais após 24h do último tratamento. ....	111
Figura 24 - Mediana dos valores de log <sub>10</sub> UFC/mL segundo a recuperação realizada em animais após sete dias do último tratamento.....	113
Figura 25 - Fotomicrografias das lâminas do grupo controle negativo (CN). Coloração hematoxilina-eosina (25a, 25b, 25c) e coloração de reativo de Schiff (25d, 25e, 25f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares. ....	115
Figura 26 - Fotomicrografias das lâminas do grupo controle positivo (C). Coloração hematoxilina-eosina (26a, 26b, 26c) e coloração de reativo de Schiff (26d, 26e, 26f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares. ....	116
Figura 27 - Fotomicrografias das lâminas do grupo PP-CUR. Coloração hematoxilina-eosina (27a, 27b, 27c) e coloração de reativo de Schiff (27d, 27e, 27f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares. ....	117

Figura 28 - Fotomicrografias das lâminas do grupo PP-CUR-PDT. Coloração hematoxilina-eosina (28a, 28b, 28c) e coloração de reativo de Schiff (28d, 28e, 28f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares. ....118

Figura 29 - Fotomicrografias das lâminas do grupo NIS. Coloração hematoxilina-eosina (29a, 29b, 29c) e coloração de reativo de Schiff (29, 29e, 29f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares. ....119

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Composição das formulações selecionadas à serem caracterizadas dos diagramas previamente construídos.....	47
Tabela 2 - Tempos pré-determinados de irradiação das amostras de DMSO, PEI-0%, PLU-0% e PP-0% sem e com a incorporação de curcumina 80 µM e as respectivas doses de luz (J/cm <sup>2</sup> ).....	54
Tabela 3- Descrição do número de animais em cada grupo avaliado, na avaliação do sistema PP-CUR-0% no tratamento da candidose bucal. ....	64
Tabela 4 - Composição das amostras precursoras de cristal líquido selecionadas e suas respectivas diluições com saliva artificial e adição de curcumina. ....	74
Tabela 5 - Razão entre as distâncias interplanares (d <sub>2</sub> /d <sub>1</sub> e d <sub>3</sub> /d <sub>1</sub> ), distância do espaçamento (nm) entre duas camadas adjacentes para as mesofases lamelares e a distância entre as arestas dos cilindros para as mesofases hexagonais das amostras PEI, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PLU, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% e suas estruturas.....	79
Tabela 6 - Percentual de curcumina total liberada dos sistemas precursores de cristais líquidos PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%, após 24 horas de análise. ....	90
Tabela 7 - Coeficiente de liberação <i>in vitro</i> da curcumina (24h) obtida, pelos de diferentes modelos matemáticos para as formulações PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%.....	92
Tabela 8 – Avaliação da ação antibiofilme. Valores médios e desvio-padrão em Log <sub>10</sub> (UFC/mL) obtidos em dois dias diferentes (n=6), utilizando curcumina 80 µM com tempo de pré-irradiação de 20 minutos e dose de luz de 10,07 J/cm <sup>2</sup> . ....	104
Tabela 9- Valores das médias da porcentagem de viabilidade dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> , em RPMI a 37°C, por meio de XTT.....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Abs</b>	Absorbância
<b>Ca</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CEB</b>	Células epiteliais bucais
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CUR</b>	Curcumina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>F+L-</b>	Com fotossensibilizador e sem irradiação de luz
<b>F+L+</b>	Com fotossensibilizador e com irradiação de luz
<b>F-L-</b>	Sem fotossensibilizador e sem irradiação de luz
<b>H/E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>K</b>	Índice de consistência
<b>LED</b>	do Inglês <i>Light Emitting Diode</i>
<b>MLP</b>	Microscopia de luz polarizada
<b>n</b>	Índice de escoamento
<b>Nis</b>	Nistatina
<b>Pa</b>	Pascal
<b>PBS</b>	do Inglês <i>Phosphate-buffered saline</i> .
<b>PDT</b>	do Inglês <i>Photodynamic Therapy</i> , Terapia Fotodinâmica.
<b>PEI</b>	Formulação contendo Polietilenoimina 0,5%
<b>PLU</b>	Formulação contendo Pluronic® 16%
<b>PP</b>	Formulação contendo Polietilenoimina 0,5% e Pluronic® 16%
<b>TPI</b>	Tempo de pré-irradiamento (do Inglês <i>Pre-irradiation Times</i> )
<b>r</b>	Coefficiente de correlação
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SAXS</b>	do Inglês <i>Small-angle X-ray scattering</i> , Espalhamento de raios X a baixo ângulo
<b>SPCL</b>	Sistema precursor de cristal líquido
<b>DMEM</b>	do Inglês Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium

## **DEDICATÓRIA**

**À minha família que sempre me apoiou em todas  
as decisões tomadas nesta jornada.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que tem me abençoado com muito além do que eu precisava e merecia! Porque Dele e por Ele são todas as coisas!

Ao Rafael, meu marido sempre presente em todos os momentos de minha vida, tornando todos esses mais leves e alegres.

À minha mãe e irmã que apesar da distância, compartilham comigo cada passo dado e vibram em todas as conquistas alcançadas. Ao meu pai, Sérgio Bernegossi (*in memoriam*), por todos os ensinamentos que tive a oportunidade de ver e ouvir durante o tempo em que tivemos juntos.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela orientação motivante de cada dia! Agradeço toda confiança dispensada a mim e a toda direção que me dá nos momentos de desesperanças. Tenho orgulho por ter feito parte do seu grupo de pesquisa!

À Profa Dra. Livia Nordi Dovigo pela co-orientação nesse trabalho, disposta a me ajudar sempre, com toda calma, paciência e atenção. Agradeço também pela realização de todo tratamento estatístico desse trabalho. Obrigada por aceitar a parceria!

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, que me acolheu no início desta jornada e me apresentou ao Prof. Dr. Marlus Chorilli. Muito obrigada por sua amizade e ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, que contribuiu imensamente com seu conhecimento nas análises histológicas. Obrigada pela parceria.

À Maíra, pela ajuda e suporte que de prestou em várias etapas desse trabalho, agradeço muito por sua amizade!

À Roberta por todos os conselhos e por toda ajuda que me ofereceu quando eu mais precisava!

À Karen dos Santos e Matheus Aparecido dos Santos, que me enriquecem com seus conhecimentos e partilham quando eu mais necessito.

À Cristiane Akemi Myashiro, com toda a ajuda, principalmente nos longos dias de testes microbiológicos.

À Bruna Lallo Silva, Bruno Leonardo Caetano, Eloísa Berbel Manaia, Marina e João por realizarem o ensaio de SAXS e pela amizade.

À Ana Paula da Silva, aluna de doutorado do Instituto de Física de São Carlos, por toda ajuda na execução do teste de fotodegradação da curcumina.

À Profa Dra Sandra Pulcinelli do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, por permitir o uso do reômetro. À Danúbia por toda atenção e suporte nos ensaios reológicos.

À Profa Palmira Daflon Gremião por disponibilizar o cromatógrafo líquido de alta eficiência e o texturômetro. Agradeço também por todos os ensinamentos compartilhados.

À Camila Fernanda Rodero, por toda ajuda em todo o experimento *in vivo*. Obrigada pela paciência e dedicação em compartilhar todo o seu conhecimento nesta área!

À Camila Cristina de Foggi, por toda ajuda em todos os momentos que precisei no laboratório e também pela amiga tão especial que se tornou para mim! Você faz os meus dias mais alegres!

Aos meus amigos queridos, Alice Haddad do Prado, Charlene Kiill, Fabíola Garavello Prezotti, Fernanda Isadora Boni, Fernanda Kolenyak dos Santos, Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian, João Augusto Oshiro Júnior, Leonardo

Miziara, Liliane Pedreiro, Marcia Oyafuso, Mariana Rillo Sato e Natalia Noronha Ferreira, por todo apoio emocional e profissional no decorrer deste trabalho. Agradeço imensamente a amizade.

Aos Profs. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima e Eduardo Vergani, que permitiram o uso do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos da Faculdade de Odontologia de Araraquara para que esse trabalho fosse desenvolvido. Muito obrigada pela parceria!

À Paula Aboud Barbugli, pelas ideias e sugestões dadas para a realização dos ensaios com cultura de células, as quais foram de grande valia para a conclusão desse trabalho.

Ao Jeffersson Trigo Gutierrez e Vinícius Tatsuyuji Sakima por todo acompanhamento do início dos ensaios microbiológicos. Obrigada por toda paciência em me ensinar as técnicas.

À Juliana Cabrini de Carmello, por compartilhar toda sua experiência com animais. Você foi essencial para que essa etapa fosse realizada! Muito obrigada.

À Beatriz Helena Dias Panariello, Bruna Natalia Alves da Silva Pimentel, Bruna Michelli Novelli, Carmélia Isabel Vitorino Lobo, Carolina Santezi, Elkin Hahir Florez Salamanca, Fernanda Alves Dias de Sousa, Geisiane Helena Gomes Bueno, Ivo Mateus Pinatti, Karem Janeth Rimachi Hidalgo, Lígia Sabino dos Reis, Luana de Sales Leite, Lucas Portela Oliveira, Maria Isabel Amaya Arbelaez, Maria Silvia Mauricio Rigolin, Midian Clara Castillo e Kassia Dias da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por todo auxílio e amizade!

Às Profas, Dra. Marlise Inês Klein e Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, pelas sugestões e correções tão importantes para este trabalho no exame de qualificação. Muito obrigada!

Aos Profs, Dr. Adriano Antunes De Souza Araújo, Dra. Carolina Patricia Aires, Dra. Ana Claudia Pavarina, Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, por toda atenção e tempo dispensados, a fim de executar a correção desta Tese na Defesa de meu título de Doutora. Agradeço imensamente!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Barbara Krammer, que me supervisionou durante os 6 meses no Estágio de Pesquisa no Exterior, no departamento de Biologia Molecular da Universidade de Salzburg (Áustria). Obrigada por toda paciência e disposição em compartilhar seu conhecimento. Agradeço também ao Dr. Thomas e a Nicole Maeding por me ensinarem os protocolos e por todo o tempo que dedicaram à mim.

À Profa. Dra. Natália Inada do Instituto de Física de São Carlos, por toda ajuda concedida na realização desse trabalho, assim como para o trabalho realizado no BEPE.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que me concedeu todo o apoio financeiro necessário (nº processo 2014/22045-9) para o desenvolvimento deste trabalho, tornando o meu sonho real! Assim como o apoio ao estágio na “Universität Salzburg” - Áustria (nº processo 2016/14167-2), a qual foi uma das experiências mais incríveis que pude ter em minha vida.

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são os agentes etiológicos da candidose, tais quais podem estar presentes em diversas regiões do corpo humano, como por exemplo a boca, onde a espécie mais frequentemente encontrada é a *Candida albicans* (DE ROSSI & CIARROCCA, 2017; SCHERMA et al., 2004). A candidose bucal pode acometer todas as faixas etárias, porém crianças, idosos e pessoas imunodeficientes são mais afetados.

Atualmente, pesquisadores expressam uma preocupação relevante quanto à relação entre infecções causadas por este microrganismo oportunista e o câncer. Muitos estudos apontam associação entre *Candida albicans* e processos cancerosos por vários mecanismos, como a produção de subprodutos cancerígenos, desencadeamento de inflamações, indução da resposta Th17 e mimetismo molecular. Para isso, constantes pesquisas estão em busca do controle desse tipo de infecção, com o intuito de estudar novas abordagens terapêuticas para, conseqüentemente, se evitar o efeito pré-tumoral desta espécie (RAMIREZ-GARCIA et al., 2014).

Um dos grandes problemas enfrentados pela terapia envolvendo a administração de antifúngicos é a alta resistência que estes microrganismos têm apresentado contra os fármacos usualmente empregados (LOHSE et al., 2018). Sendo assim, é de suma importância o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento para infecções, dentre elas a busca de novas moléculas bioativas (COUTINHO et al., 2004).

Fontes naturais apresentam um vasto campo de estudo para a descoberta de novos compostos medicinais. É possível observar pesquisas de compostos vegetais em fase clínica, inclusive no tratamento terapêutico de doenças causadas por infecções microbianas na cavidade bucal (BHAVANA et al., 2017; WILLIAMS et al., 2011; PIZZO et al., 2008)

A curcumina é um composto natural isolado do açafrão, apresenta baixa solubilidade em água e éter, muito solúvel em etanol, dimetilsulfóxido, acetona e outros solventes orgânicos (CHASSAGNEZ et al., 1997; SHARMA et al., 2005).

Pesquisadores estudaram a ação fungicida *in vivo* da curcumina frente à *Candida* em espécies *albicans* e *não-albicans* e observaram uma redução significativa da carga fúngica (SHARMA et al., 2010). Martins e colaboradores (2009) avaliaram o efeito inibitório da curcumina sobre a adesão de espécies de *Candida* em células epiteliais bucais (CEB) e observaram que, quando comparado ao fluconazol, a curcumina foi mais eficiente em inibir a aderência de espécies de *Candida* em CEB, principalmente de cepas isoladas da mucosa de pacientes imunodeprimidos.

Apesar das promissoras atividades farmacológicas da curcumina, depara-se com algumas características físico-químicas tais como fotossensibilidade, hidrólise rápida em pH alcalino e reduzida solubilidade aquosa em condições de pH ácido e fisiológico, que podem restringir seu emprego como um agente terapêutico (FONSECA-SANTOS, 2015; SHARMA et al., 2005).

Wang et al. (1997) revelaram, em estudos *in vitro* que, em condições fisiológicas, mais de 90% da curcumina é degradada. Em pH ácido a curcumina tem sua estabilidade grandemente aumentada, devido à manutenção da estrutura dieno conjugada da molécula. Quando os valores de pH são ajustados para neutro ou alcalino, o próton do grupamento fenólico é removido, levando à destruição desta estrutura. Desta forma, a incorporação da curcumina em um sistema de liberação clinicamente adequado, seguro e efetivo visando à sua administração bucal demonstra ser vantajosa para promover o seu uso no tratamento da candidose bucal, objetivando aumentar a sua substantividade no local de ação, de forma a diminuir a dose.

A mucosa bucal é robusta, ou seja, permite recuperação rápida após o estresse ou dano, além de apresentar um ótimo fornecimento de sangue e ausência do efeito de primeira passagem, o que evita o metabolismo pré-sistêmico do fármaco pelo trato gastrointestinal.

Sendo assim, observa-se que a cavidade bucal é uma via interessante para o tratamento de doenças, possibilitando a aplicação de fármacos em sistemas de liberação e conseqüentemente prolongamento da sua permanência *in situ* (VERMA & GARG, 2001).

Apesar de apresentar essa série de vantagens, a administração bucal apresenta algumas limitações, devido, principalmente, à secreção contínua da saliva, o que pode levar à diluição e possível ingestão do fármaco causando eliminação da forma farmacêutica (HEARNDEN et al., 2012; CALIXTO, 2013).

Os sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) apresentam-se como sistemas de liberação promissores para administração bucal de fármacos. Eles possibilitam a incorporação de fármacos lipofílicos, promovem a liberação controlada de fármacos, protegem fármacos sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação (OLIVEIRA et al., 2009), além de apresentarem excelente potencial mucoadesivo (CARVALHO et al., 2012).

Esses sistemas, quando inseridos na cavidade bucal, incorporam a saliva presente no ambiente e são capazes de transitarem para sistemas líquido-cristalinos de mesofases mais viscosas, promovendo uma maior substantividade do fármaco (BRUSCHI et al., 2008; FONSECA-SANTOS, 2013).

O emprego de polímeros na fase aquosa dos SPLC também colabora para o aumento da mucoadesão. A exemplo, o poloxamer tem sido cada vez mais explorado para essa finalidade, sendo muito conhecido por suas propriedades termorreversíveis, em que a transição do estado sol-gel é dependente da temperatura. A termogelação é resultante das interações entre os diferentes segmentos do copolímero. À medida que a temperatura aumenta, este polímero agrega-se em micelas devido à desidratação do bloco hidrofóbico, a qual é seguida pela transição da fase sol para gel (BAEK et al., 2012; DUMORTIER et al., 2006). Há polímeros que promovem a internalização celular de fármacos, como a polietilenoimina, que tem sido muito investigada por sua capacidade de interagir, por forças de atração, com proteínas extracelulares de membrana, que apresentam carga negativa, em razão da expressão elevada de fosfatidilserina, um fosfolípido aniônico (JERE et al, 2009).

Embora as terapias com moléculas bioativas, como a curcumina, tenham se mostrado promissoras, a incidência da candidose bucal ainda é bastante alta. Logo, a combinação de terapias para pacientes com candidose bucal pode ter papel fundamental na redução das manifestações e na adesão do paciente ao tratamento (ANDRADE et al., 2013). A terapia fotodinâmica (TFD, em inglês PDT - *photodynamic therapy*) tem sido sugerida promissoramente como alternativa para o tratamento de infecções fúngicas, apresentando bons resultados e baixo custo (DOVIGO et al., 2013). Esta terapia baseia-se na utilização de uma substância fotossensibilizante (FS) e luz para provocar um dano seletivo no objeto alvo, sendo a seletividade essencial para o sucesso do tratamento (SCHMITT et al., 2012).

O mecanismo de ação da PDT inicia-se com a absorção de luz pelo fotossensibilizador, seguido pela elevação do seu estado fundamental a um estado triplete fotoativo. Neste estado, as moléculas do FS podem passar seus elétrons para biomoléculas que estão ao seu redor. Este evento pode seguir dois tipos de mecanismos: o mecanismo tipo I, que trabalha com substrato local, produzindo radicais citotóxicos e o mecanismo II, que opera com a geração molecular de oxigênio no estado singlete, o qual é capaz de reagir com membranas celulares, ácidos nucleicos e peptídeos. Este oxigênio é altamente reativo, sendo de difusividade delimitada, o que melhora a resposta localizada sem danificar os tecidos circunvizinhos (GONZALES & MAISCH, 2012).

Uma vez que a curcumina apresenta alta capacidade da absorção de luz em comprimentos de onda próximos ao azul, ela pode ser usada como um potencial FS para o tratamento de lesões superficiais, como a candidose bucal, uma vez que estas não requerem profunda penetração da luz nos tecidos para o seu tratamento (DOVIGO et al, 2011). Dovigo et al. (2011) observaram a susceptibilidade de isolados clínicos de *Candida spp.* a efeitos fotodinâmicos da curcumina. Dovigo et al. (2013) verificaram também que a curcumina pode mediar a fotoinativação de *Candida albicans* em camundongos com candidose bucal (DOVIGO et al., 2013). Em ambos os estudos, os autores utilizaram DMSO para veicular a curcumina, em virtude de sua baixa solubilidade em água. Todavia, trata-se de um veículo inadequado do ponto de vista biológico. Um outro aspecto relacionado aos FS que merece destaque é que eles podem ser absorvidos e

distribuídos pelo corpo, levando à fotossensibilização generalizada e fraca aceitação por parte dos pacientes ao tratamento. Uma maneira de evitar este efeito consiste em veicular o FS em um sistema de liberação para melhorar o seu direcionamento às células-alvo (ROSSETTI et al., 2011).

Assim, nesse estudo foi sugerida a incorporação de curcumina em SPLC mucoadesivos, oferecendo uma promissora ferramenta para o tratamento da candidose bucal associada à PDT.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Sistemas de cristais líquidos e precursores

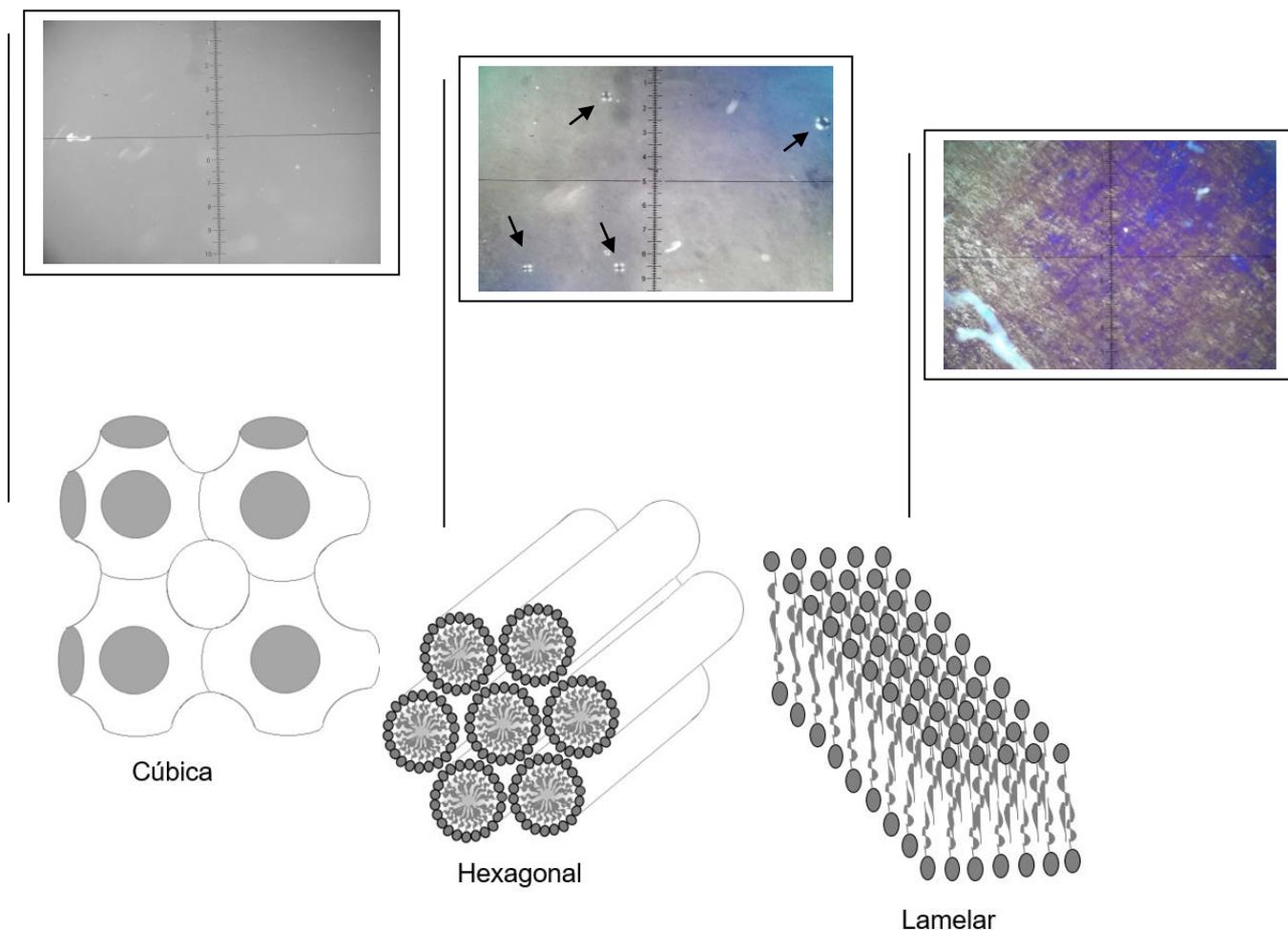
O primeiro relato sobre cristais líquidos se deu em 1888, feito pelo austríaco Friedrich Reinitzer, quando em um estudo observou que benzoato de colesterila quando fundido apresentou-se como um líquido turvo e, após um aumento da temperatura, apresentou-se um líquido transparente. Porém, o termo “cristais líquidos” foi utilizado um ano depois, pelo pesquisador alemão Otto Lehmann, quando observou que os compostos oleato de amônio e p-azoxi-fenetol se fundiam transitando para um estado intermedial, líquidos com birrefringência. Esse estado intermedial foi chamado de mesofase, em que o prefixo grego “meso” tem o significado de “intermediário”. As mesofases são subdivididas em duas classes: termotrópicas, que são formados por influência da temperatura e liotrópicas, dependentes dos solventes relacionados (CHORILLI et al., 2009; BECHTOLD 2005; FORMARIZ et al., 2005; LEHMANN, 1889; REINITZER 1888).

Sistemas de cristais líquidos são preparações que exibem propriedades físicas características de líquidos, porém concomitantemente, também a de estruturas de sólidos cristalinos. Os cristais líquidos do tipo liotrópico apresentam três principais tipos na classificação estrutural de mesofases, como apresentado na Figura 1: as cúbicas, hexagonais e lamelares, as quais influenciam para o posicionamento do fármaco, tamanho de partícula e viscosidade no sistema. Eles são considerados versáteis, uma vez que são compatíveis com fármacos hidro e lipofílicos, oferecendo em muitos casos, proteção à degradação (RAJABALAYA et al., 2017).

Os sistemas com mesofases cúbicas são de organização mais complexa, apresentam em sua maioria um arranjo de simetria cúbica, não sendo capazes de desviar um plano de luz incidente, por isso são caracterizados como isotrópicos, apresentando campo escuro. As mesofases hexagonais são formadas pelo arranjo de agregados em forma de cilindros longos formando estruturas bi ou tridimensionais, são anisotrópicas, ou seja, quando submetidas a um feixe de luz são capazes de desviá-lo, sendo possível a observação de estrias. Ao se formar camadas intercaladas de tensoativos e solvente (geralmente água),

estabelecendo uma rede uni ou bidimensional, são designadas como mesofases lamelares, que por meio da análise em microscópio de luz polarizada é possível a visualização de cruces de malta (CHORILLI et al., 2009).

**Figura 1-** Representação organizacional das mesofases cúbica, hexagonal e lamelar e suas respectivas estruturas microscópicas, campo escuro, cruces de malta e estrias.



(Fonte: adaptado de Bernegossi et al., 2016).

Para sistemas de liberação de fármacos, os cristais líquidos tem sido uma ampla área de pesquisa, podendo ser de via oral, tópica, intravenosa e transdérmica (RAJABALAYA et al., 2017; DOS SANTOS RAMOS et al., 2015).

Estudo realizado por Nesseem (2001) descreve a formação de um sistema líquido cristalino para a veiculação do antifúngico itraconazol, contendo éter estearílico de polioxietileno (21) como tensoativo, álcool cetoestearílico como co-

tensoativo, silicone como fase oleosa e fase aquosa contendo água, propilenoglicol e conservante. Para a formação do sistema, o pesquisador fundiu a fase oleosa a 70 °C em banho-maria e incorporou 1% de itraconazol, e transferida gota a gota para a fase aquosa, previamente aquecida na mesma temperatura e sob agitação em alta velocidade. O sistema foi arrefecido e armazenado em temperatura ambiente durante 48h para caracterização, teste de sensibilidade *in vivo* e atividade *in vitro* contra *Candida albicans*. Na análise em microscópio de luz polarizada, observou-se cruces de malta, características de sistemas líquido-cristalinos de mesofase lamelar, as quais mantiveram-se estáveis durante um mês após o preparo da formulação. Após dez minutos da aplicação em pele humana, a formulação foi removida com água e não houve nenhum sinal de eritema. Análise de calorimetria exploratória diferencial mostrou um pico maior de transição em 120 °C e na análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho transformada de Fourier não se observou qualquer interação do itraconazol com o tensoativo. Na análise antimicrobiana, realizada por mensuração do halo de inibição, o sistema líquido cristalino apresentou maior inibição de *Candida albicans* ( $30,4 \pm 1,14$  mm) que as outras formulações controle, composta por gel de hidroxietilcelulose ( $19,6 \pm 1,14$  mm) e monoestearato de glicerila ( $14,8 \pm 0,83$  mm) (NESSEEM, 2001).

Boyd e colaboradores (2006) estudaram dispersões de hexossomas para a veiculação de irinotecano contendo 9,4% (p/p) de glicerato de oleila, 0,6% (p/p) de ácido oleico, 0,75% (p/p) de poloxamer 407, 0,5%(p/p) de base de irinotecano e 88,75% (p /p) de água para injeção contendo 5% (p/p) de sorbitol. A dispersão foi preparada aquecendo a fase lipídica, poloxamer 407 e o fármaco à 60 °C, até a obtenção de uma solução límpida e vertida na fase aquosa, também aquecida à 60 °C e agitada durante 1,5 min em homogeneizador UltraTurrax a 11.000 rpm com haste dispersora e em seguida transferida para homogeneizador termostático, mantendo a temperatura de 60 °C. Posteriormente a formulação foi submetida a agitação magnética por 30 minutos e conseqüentemente, arrefecida até temperatura ambiente. Na caracterização por espalhamento de luz a baixo ângulo e microscopia crio-eletrônica (após sete dias de seu preparo), eles constataram a presença de estrutura hexagonal, com média do tamanho das partículas de  $188,6 \pm 0,9$  nm. No ensaio de liberação, foi possível observar que o irinotecano teve sua liberação controlada após dez minutos (aproximadamente

80%) e manteve-se em níveis constantes até uma hora do experimento realizado. Tal estudo mostrou que a formulação de irinotecano em hexossomas à base de glicerato tem grande potencial de melhorar a retenção do fármaco na forma de lactona a pH quase neutro. O tamanho das partículas obtidas apresentou adequado para futuras projeções em estudo de modelo animal com administração intravenosa (BOYD et al., 2006).

Em outro estudo realizado em 2007, sistemas líquidos cristalinos para aplicação via transdérmica foram investigados por Lopes e colaboradores, viabilizando a administração da vitamina K (vitK). Eles analisaram a penetração de formulações à base de monooleína (MO), gel e nanodispersão, comparando com uma terceira diferente formulação à base de vaselina líquida. As formulações, vaselina líquida, gel de fase hexagonal (MO-vitK-água a 77,5/ 2,5/ 20, p/ p/ p) e nanodispersão de fase hexagonal (MO-vitK-poloxamer-água a 15/ 2,5/ 0,9/ 81,6, p/ p/ p / p), foram avaliadas em pele de orelha de porco em sistema de célula de difusão de *Franz*. Os autores observaram que a formulação de vaselina entregou a vitK após 12h de análise, principalmente no estrato córneo ( $9,50 \pm 0,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), enquanto que  $4,90 \pm 1,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de vitK foi entregue para a epiderme (E) + derme (D) no mesmo período. Enquanto que a vitK em gel e nanodispersão tiveram um aumento de aproximadamente duas vezes mais no estrato córneo, quando comparado com a vaselina líquida e 2,0-3,7 vezes mais vitK para o E + D. A distribuição transdérmica da vitK foi aumentada três vezes quando incorporada na nanodispersão (LOPES et al., 2007).

Chorilli e colaboradores (2009) publicaram um estudo de desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos usando diferentes tipos de silicões. Eles desenvolveram cinco sistemas diferentes com a elaboração de diagrama ternário de fases; três, contendo silicone fluido de co-polímero glicol como fase oleosa, água e apenas se diferenciavam no tensoativo, poliéter funcional siloxano, trilauril-4-fosfato ou polissorbatato 80. E outros dois sistemas contendo adipato de diisopropila como fase oleosa, água e diferenciando os tensoativos, poliéter funcional siloxano ou silicone fluido de co-polímero glicol. Os sistemas foram preparados por mistura direta dos componentes, e quando apresentavam alta viscosidade eram aquecidos em banho termostatizado a 45 °C para melhor homogeneização e posteriormente, leve homogeneização com a

utilização de bastão de vidro. Os sistemas foram caracterizados visualmente como sistema líquido transparente, sistema viscoso transparente, sistema semitransparente, sistema líquido opaco, sistema viscoso opaco e separação de fases. As formulações que não mostraram separação de fases foram analisadas em microscópio de luz polarizada. Após as análises, concluíram que tanto o sistema contendo silicone fluido de co-polímero glicol, poliéter funcional siloxano e água, quanto o sistema contendo adipato de diisopropila, poliéter funcional siloxano e água, apresentaram fases líquido-cristalinas do tipo lamelar em sua estrutura e que após 15 dias mantidas em estufa (37 °C), as formulações apresentaram arranjo hexagonal, sugerindo que a temperatura influencia na organização do sistema líquido-cristalino obtido.

Carvalho e colaboradores (2010) desenvolveram sistemas líquido-cristalinos para liberação do antirretroviral, zidovudina. Os sistemas foram constituídos de álcool cetílico de polioxietileno (20) polioxipropileno (5) como tensoativo, ácido oleico como fase oleosa e água. Após o preparo dos sistemas por titulação aquosa e agitação manual com bastão de vidro, eles foram avaliados por microscopia de luz polarizada e espalhamento de luz a baixo ângulo, apontando que foi possível a obtenção de sistemas de microemulsão (55% tensoativo (T), 35% fase oleosa (FO) e 10% fase aquosa (FA) e 55% T, 25% FO e 20% FA e lamelar (55% T, 25% FO e 20% FA). Na análise reológica de fluxo, constataram que as microemulsões se comportavam como fluidos newtonianos e os de mesofase lamelar, não newtonianos como fluido pseudoplástico. Em seguida, foi realizado o ensaio de liberação da zidovudina, a qual apresentou uma liberação exponencial, demonstrando o modelo matemático Weibull, ou seja, que acontece por difusão. Sendo assim, após essas constatações, concluíram que o sistema apresentou como potenciais vetorizadores do antirretroviral.

O sistema líquido cristalino pode ser obtido diretamente e também de maneira indireta, ou seja, o desenvolvimento de sistemas conhecido como precursores de cristais líquidos. Carvalho e colaboradores (2013) propuseram um sistema de liberação para a zidovudina que fosse um precursor de cristais líquidos de baixa viscosidade para via nasal. A formulação contendo os mesmos componentes que o estudo anterior, com 55, 30, 15% (p/p) de tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, respectivamente, apresentando em análise com

microscópio de luz polarizada, campo escuro. Os autores realizaram então uma diluição de 1:1 (p/p) da formulação preparada em muco nasal artificial, o qual apresentou anisotropia, logo, característico de cristais líquidos de mesofase lamelar. Realizaram também o ensaio de mucoadesão *in vitro*, usando mucosa nasal suína ou discos de mucina, o qual quando comparado o sistema precursor com o sistema já adicionado o muco nasal artificial, a força mucoadesiva exercida foi triplicada. No ensaio de permeação *in vitro*, foi realizada a comparação entre amostras de zidovudina em solução aquosa e incorporada na formulação diluída em muco nasal artificial, exibindo um aumento de 18 vezes na permeabilidade quando incorporada na formulação. Os autores realizaram também avaliação *in vivo* para a detecção da concentração plasmática após a administração intranasal da formulação de zidovudina a uma dose de 8 mg/kg. Tal ensaio apontou que a formulação apresentou rápida absorção ( $T_{max}$ = 6,70 min), sendo promissora para entrega sistêmica de fármacos, como a exemplo, a zidovudina.

Salmazi e colaboradores (2015) estudaram os mesmos componentes, porém substituindo a fase aquosa por hidrogel de quitosana, visando a incorporação de curcumina. Eles observaram que após a adição de simulado de muco vaginal em sistemas de microemulsões, estes transitaram para sistemas líquido cristalinos, exibindo um maior trabalho de mucoadesão *in vitro*, testado com mucosa vaginal suína. Em análise reológica de fluxo contínuo a formulação ainda antes de ser diluída com muco vaginal artificial apresentou comportamento newtoniano, característico de um sistema pouco estruturado e após a diluição passou a exibir comportamento de fluido não newtoniano, pseudoplástico o que é desejável para medicamentos destinados a via vaginal. Ainda testaram a concentração mínima inibitória da formulação precursora de cristal líquido incorporada de curcumina contra uma cepa de *Candida albicans* ATCC 18804 e outra clínica CAV2, a qual foi dezesseis vezes mais potente contra a cepa ATCC e duas vezes mais potente contra a cepa clínica, quando comparada a curcumina livre. Eles concluíram que a união dos resultados demonstrou que a formulação precursora de cristais líquidos é viável para a administração vaginal de curcumina é uma alternativa promissora para o tratamento da candidose vaginal.

Estudos realizados por Bernegossi e colaboradores (2016) também evidenciaram que ao elevar a concentração de fase aquosa de microemulsões

compostas de ácido oleico e álcool etílico etoxilado e propoxilado para a incorporação de um peptídeo antimicrobiano, tinham sua estruturação alterada para cristais líquidos de mesofase lamelar (7,85 nm), confirmadas pela técnica de microscopia de luz polarizada e SAXS. Também observaram os mesmos resultados que os estudos anteriores relacionados com precursores de cristais líquidos, o aumento da força de mucoadesão, a transição de comportamento Newtoniano para não Newtoniano. No teste de inibição de biofilme multiespécie salivar, a formulação com baixas concentrações de fase aquosa, caracterizada como microemulsão incorporada com 1 mg/mL do peptídeo KSL-W inibiu 100% o crescimento das unidades formadoras de colônias, quando comparadas ao controle positivo.

## 2.2. Candidose bucal

Na microflora humana, é facilmente encontrada leveduras como a do gênero *Candida sp.*, variando em relevância de crescimento dependendo da região do corpo, podendo ser interferido pelo sistema imunológico comprometido ou mesmo quando em processo de antibioticoterapia (BRUNETTI, 2004). Na cavidade oral, a espécie *Candida albicans* é a mais frequentemente encontrada, a qual se destaca por se aderir em mucosas superficiais orais e também em aparelhos ortodônticos e protéticos. O poder de adesão desse fungo oportunista está relacionado a diversos fatores como fluxo salivar, pH, a presença de bactérias e formação de hifas, associada a forças hidrofóbicas e eletrostáticas. Destacam-se também que outros fatores como mudanças de hábitos alimentares, tabagismo, má higiene bucal, alterações sistêmicas como hormonais, o uso de alguns medicamentos, imunossupressão, AIDS, radioterapia, quimioterapia e, como própria doença sistêmica, a diabetes mellitus, aumentam a incidência da *Candida albicans* na boca. Além de *Candida albicans*, também são encontradas outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii*, na cavidade oral. Essas espécies também são comensais, ou seja, se beneficiam do organismo de maneira harmoniosa e não resulta em prejuízo para o hospedeiro, no sistema digestivo

e genital feminino (WEBB et al., 1998; ÁLVARES et al., 2007, STRAMANDINOLI et al., 2010).

O desequilíbrio entre a *Candida* e o hospedeiro foi relatado pela primeira vez na Alemanha, em novembro de 1839, pelo professor universitário Bernhard von Langenbeck, que publicou em "*Neue notizen aus dem Gebiete der Natur - und Heilkunde*" a descrição de um fungo como agente etiológico da candidose orofaríngea e esofágica, após uma autópsia realizada em um cadáver que morreu de febre entérica que apresentava manchas membranosas na cavidade oral (KNOKE & BERNHARDT, 2006).

A doença pode acometer toda mucosa bucal, palato e dorso da língua, podendo apresentar sintomas moderados de acordo com sua intensidade, como a sensação de paladar desagradável, dificuldade em deglutir e sensação de queimação (SCHERMA et al., 2004).

Pesquisadores têm buscado protocolos em modelos animais para a aplicação de testes de novos insumos ativos contra a candidose bucal. Takakura e colaboradores (2003) se dedicaram em estabelecer um novo modelo de candidose oral em ratos, mimetizando uma infecção natural em humanos. Neste protocolo desenvolvido eles obtiveram a formação de biofilmes, em diferentes intensidades, os quais eram macroscópicos sobre o dorso das línguas dos animais testados. A instalação da infecção e conseqüentemente a formação do biofilme permitiu que fosse estimada a carga fúngica nos tecidos infectados. Eles iniciaram o protocolo com a aplicação injetável subcutânea de prednisolona (100 mg/kg) nas ratas de seis semanas de vida. Já nessa etapa eles introduziram o fornecimento de cloridrato de tetraciclina 0,83 mg/mL na água disponível para a ingestão dos animais, tal procedimento ocorreu até o término do estudo. Após três dias da imunossupressão, os animais foram anestesiados com 50 µL de clorpromazina à uma concentração de 2 mg/mL, intramuscular na região do fêmur e em seguida, eles inoculavam utilizando swab embebido em uma suspensão de isolado clínico de *Candida albicans* (TIMM2640) sobre o dorso da língua dos animais. O isolado, após ser coletado do paciente com candidose bucal, foi congelado a -80°C em meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose, contendo 0,5% de extrato de levedura e 10% de glicerol. Após a reativação em placas contendo ágar, colônias foram transferidas para meio de cultura RPMI1640 aditivado de

2,5% de soro fetal bovino e padronizada à  $2,5 \times 10^7$  células/mL. Após eles realizaram a avaliação macroscópica da infecção, categorizando as lesões em uma escala de 0 a 4, onde: 0= tecido com aparência normal; 1= manchas brancas em menos de 20%; 2= manchas brancas em menos de 90%, mas acima de 21%; 3= manchas brancas em mais de 91%; 4= manchas brancas espessas como pseudomembranas em mais de 91%. Na intenção de avaliar a progressão da doença, eles realizaram fricções com swab e transferiram para 5 mL de solução salina estéril, levaram ao vórtex e realizaram diluições seriadas (100 x), plaquearam em ágar e incubaram a 37 °C por 20h. Realizaram também a análise histopatológica. Na avaliação microbiológica, constataram uma recuperação de  $10^5$ - $10^6$  UFC em cada animal experimental infectado e no estudo histopatológico observaram fungos invadindo a camada epitelial (TAKAKURA et al., 2003).

### 2.3. Fototerapia e curcumina

A Terapia Fotodinâmica, em inglês *Photodynamic Therapy (PDT)*, tem se destacado como um método alternativo no tratamento de diversos tipos de doenças. Apesar da PDT ser vista como uma nova possibilidade de tratamento, o emprego da luz no campo da ciência da vida, se revela em aparições nos tempos pré-históricos, em que o homem conferia a repercussão de resultados benéficos da luz a alguns fatos religiosos, mitológicos e até mesmo sobrenaturais (BAGNATO, 2008).

O princípio da PDT se dá com a união de necessariamente 3 componentes: fotossensibilizador, uma fonte de luz visível no comprimento de onda ideal e oxigênio. O fotossensibilizador é aplicado no local desejado (ou via sistêmica) e, em seguida, aplicada a fonte de luz, que em contato com o oxigênio presente nas membranas celulares, elevará o estado fundamental do FS para excitado e havendo assim a transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a produção de radicais livres, que recebe o nome de reação do tipo I, ou pode ocorrer também a reação do tipo II, que ocorre por transferência de energia ao oxigênio, levando a formação de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). A literatura afirma que estes dois mecanismos podem ocorrer de maneira concomitante, de modo que levam à morte celular e o dano no tecido afetado. Todo esse processo gera os

hidroperóxidos, que por sua vez podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies reativas de oxigênio reagem com moléculas orgânicas não específicas, sendo assim, quaisquer macromoléculas no interior das células viram alvo acessível a terapia. A multiplicidade desses alvos impede a ocorrência de resistência celular (CIEPLIK et al., 2018).

Há relatos científicos de que sua utilização iniciou-se em meados de 1400, com a prática de tratamento de vitiligo, com o uso de plantas medicinais associadas à exposição ao sol. Porém, em 1903, o prêmio Nobel foi destinado à Niels Finsen, que estudou o tratamento de lúpus vulgar, dando assim, início às constatações científicas registradas da ação da irradiação UV. O uso da radiação solar foi relatado para o tratamento de úlceras traumáticas na Primeira Guerra Mundial (1914-1918). Goekerman iniciou estudos de tal terapia para o tratamento de psoríase em 1925. Um considerável avanço foi dado após a retratação que a estreita faixa de UVB (entre 311 e 313 nm) possibilita melhores resultados no tratamento de psoríase que UV (DUARTE et al., 2006).

Estudos realizados em 1988 avaliaram um método fotodinâmico para o tratamento de contaminantes virais presentes no sangue estocado em bancos, de modo a torná-lo seguro para sua aplicação em transfusões. No estudo, os autores utilizaram derivado de hematoporfirina para a sensibilização do vírus Herpes simplex do tipo 1 (HSV-1) e em seguida realizaram a fotoativação com luz visível a 630 nm à 5 J/ cm<sup>2</sup>. Os autores observaram que além do vírus em questão, o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), foram inativados (MATHEWS et al., 1988).

Como já dito anteriormente, sabe-se que a PDT tem sido explorada em diversas áreas da saúde, mantendo um destaque contra infecções causadas por bactérias, fungos e leveduras, sendo assim nomeada como terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDTa) (HOKARI et al., 2018; AMESCUA et al., 2017; BAGNATO, 2008).

Mima e colaboradores (2010) realizaram estudo com 71 camundongas (6 semanas de vida) portadores de candidose oral, ocasionada por imunossupressão seguida de inoculação de *Candida albicans* (10<sup>7</sup> UFC/mL) e concomitante fornecimento de tetraciclina na água potável. Após a infecção

instalada (4 dias), os animais tinham o dorso de suas línguas tratados com porfirina (Photogem<sup>®</sup>) associada a aplicação de luz LED (305 J/cm<sup>2</sup>) a 455 nm para a LED azul e 630 nm para LED vermelha (n = 5 cada). Após, eles coletaram com swabs estéreis das línguas dos animais as células que resistiram ao tratamento realizado e após essa recuperação determinaram as UFC/mL com posterior comparação com o grupo controle (não tratados). As línguas dos animais foram removidas cirurgicamente e realizada a avaliação histológica para observação de leveduras e/ ou reações inflamatórias. Eles relataram que o tratamento com Photogem<sup>®</sup> associada a PDT, luz LED azul, reduziu significativamente o número de *Candida albicans* recuperadas, quando aplicada 400, 500 e 1000 mg/L do fotossensibilizador, 1,04, 1,39 e 1,41 log<sub>10</sub>, respectivamente, porém estatisticamente os valores de log<sub>10</sub> não se diferiram, mostrando ser indiferente as concentrações testadas. Os resultados com a luz LED vermelha promoveram reduções de 1,05, 1,59 e 1,40 log<sub>10</sub>, usando respectivamente 400, 500 e 1000 mg/L de Photogem<sup>®</sup>, não havendo diferença significativa entre as LEDs azul e vermelha. Na avaliação histológica foi possível concluir que não houve prejuízo ao tecido da língua.

Um estudo realizado por González-Delgado e colaboradores (2016) avaliaram, *in vitro*, o 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)-porphyrin tetraiodide (TMPyP), potente sensibilizador hidrossolúvel conhecido por sua ação antimicrobiana. Após sua encapsulação em nanopartículas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) para administração tópica, avaliaram as características físico-químicas da formulação obtida. Os resultados relatados mostraram que a formulação apresentou características desejáveis, tal como boa fotoestabilidade (até 20 minutos), tamanhos de nanopartículas (em média 130 nm), eficiência de encapsulação (93%) e morfologia (esférica). Também realizaram análise histológica das orelhas de porco para visualização de possíveis prejuízos ao tecido que pudessem ser causados após a aplicação do fotossensibilizador incorporado às nanopartículas. Os autores relataram que o tratamento com a formulação é viável, uma vez que os tecidos não apresentaram danos.

Carmello e colaboradores (2016) realizaram um estudo *in vivo* avaliando o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de candidose bucal em camundongos. Para isso, realizaram a aplicação de Photodithazine<sup>®</sup>

incorporado em hidrogel de carboxietilcelulose, uma vez ao dia, durante 5 dias, em uma concentração de 100 mg/L. Associaram ou não o uso da luz (LED vermelha) no comprimento de onda de 660 nm e 22,3 mW e utilizaram como controle negativo a nistatina. Eles observaram que o tratamento com terapia fotodinâmica realizada com o Photodithazine® apresentou resultados semelhantes aos do grupo nistatina, sendo capaz de reduzir 3,0 e 3,2 logs<sub>10</sub>, respectivamente (CARMELLO et al., 2016).

Os fotossensibilizadores mais utilizados em casos clínicos são os derivados de hematoporfirina, considerados de primeira geração, os quais são compostos de mono, di e oligômeros de até 8 unidades de porfirina juntas por ligações éter ou éster. Esses derivados apresentam 5 bandas de absorção, sendo 1 em 370 nm a qual é designada como banda de Soret e outras 4, em maiores comprimentos de onda porém de menor intensidade, chamadas de bandas-Q. Embora apresentem bons resultados para uma vasta variedade de tumores, os derivados de hematoporfirinas também apresentam efeitos indesejáveis como a fotossensibilização cutânea dos pacientes, fazendo necessária a eliminação da exposição solar durante 4 semanas após sua aplicação, uma vez que essa é lenta cinética de eliminação desse FS. Há também os FSs de segunda geração, semelhantes a estrutura das porfirinas, mas com comprimentos de onda de 650 nm ou maiores e que induzem a uma menor fotossensibilização cutânea. São divididos em três diferentes classes, as purpurinas, as clorinas e bacterioclorinas e também as ftalocianinas e naftalocianinas. Ademais, o precursor metabólico da protoporfirina, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), age como um pró-farmaco, a qual estimula a formação de porfirina endógena. Também é possível encontrar produtos naturais fotoativos como os derivados de psoralenos que se destacam pela inativação de vírus, as perilenoquinonas, tendo como exemplo a hipericina como exemplo dessa classe de composto (BAGNATO, 2008).

Há muitos estudos sendo realizados empregando produtos naturais, como exemplo a curcumina, como fotossensibilizador. Ela é derivada do rizoma da *Curcuma longa*, amplamente utilizada como tempero, principalmente na região peninsular do Sul da Ásia onde se situam os estados da Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal e Butão. A curcumina é um corante de cor amarelo intenso, isolada do açafrão aproximadamente no século XIX. A 1900 anos antes de Cristo,

a curcumina já apresentava diversas aplicações medicinais, na época para dores, feridas, torções, problemas no fígado e dermatológicos (AGGARWAL et al., 2007). Contudo, pesquisadores se deparam com algumas desvantagens apresentadas pela curcumina, principalmente no momento de sua aplicação clínica. Sua baixa biodisponibilidade, restrita hidrofília e metabolismo hepático de primeira passagem, são desafios a serem contornados para sua administração (SUETH-SANTIAGO et al., 2014).

A curcumina apresenta atividade antimicrobiana já descrita na literatura, sendo assim de grande interesse de estudo para a área farmacêutica (MAIA, 2004). Contudo, há um interesse por potencializar seu efeito por meio de sua aplicação como FS.

Dovigo e colaboradores (2011a) realizaram estudos utilizando a curcumina como FS associada a PDT contra suspensões de *Candida albicans* ATCC 90028, além de ensaio de citotoxicidade em macrófagos. A curcumina foi testada em solução preparada inicialmente em DMSO e em seguida, diluíam em solução fisiológica até que o DMSO atingisse a concentração de 10% da solução estoque (200 µM). Foram testadas nove concentrações diferentes (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µM), com 37,5 J/cm<sup>2</sup> de luz LED com comprimento de onda de 455 nm, das quais observou que nas concentrações de 5, 10 e 20 µM obtiveram os melhores resultados. Após essa constatação, utilizando apenas essas três concentrações de curcumina, aplicaram variadas doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,6; 13,2; 26,4 J/cm<sup>2</sup>), sendo que com a dose de 5,28 J/cm<sup>2</sup> e concentração de 20 µM obtiveram a total inativação de *Candida albicans*. No ensaio citotóxico (MTT), eles observaram que quando comparado ao controle negativo, considerado 100% de viabilidade celular, houve uma redução significativa de 7,13%, 17,22%, 82,51%, 73,26% e 86,39% quando aplicada a solução de curcumina sobre a cultura celular nas concentrações de 0,5; 1, 5; 10 e 20 µm, respectivamente.

Dovigo e colaboradores também realizaram um outro estudo *in vitro* contra quinze isolados clínicos de *Candida*, sendo cinco de *Candida albicans*, cinco de *Candida tropicalis* e cinco *Candida glabrata*, tanto em formas planctônicas quanto em biofilmes. As suspensões de *Candida*, independente da espécie, foram

padronizadas com  $10^7$  células/mL de meio de cultura. Após testes preliminares em suspensão planctônica para a seleção da melhor concentração de curcumina (5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) e dose de luz (5,28; 18; 25,5 e 37,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), selecionaram os melhores resultados que foi utilizando a concentração de 20  $\mu\text{M}$  de curcumina em solução e as doses de luz 5,28 e 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  para prosseguirem com o experimento da levedura em biofilmes. Além desses parâmetros, adicionaram outras duas concentrações de curcumina, 30 e 40  $\mu\text{M}$ . Para a formação do biofilme, eles realizaram a transferência de 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão padronizada em  $10^7$  células/mL (meio RPMI) para uma placa de 96 poços, sob agitação orbital de 75 rpm em uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Após 90 min, para a chamada fase de adesão, o meio de cultura era aspirado e substituído por 150  $\mu\text{L}$  de meio estéril e levado para mais 48h de incubação a  $37^\circ\text{C}$ . Antes da aplicação das amostras testadas, eles realizaram duas lavagens com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e então, finalmente a aplicação de 100  $\mu\text{L}$  da solução de curcumina nas diferentes concentrações. Em seguida, deixaram por 20 minutos a placa ao abrigo de luz, para o chamado tempo de pré-irradiação e em seguida realizaram a aplicação da luz. Após, a viabilidade celular foi conferida por meio do ensaio de XTT, em que mensuraram a absorbância de 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura transferido para uma nova placa de cultura de 96 poços. Avaliaram também a biomassa do biofilme por meio do teste de coloração de cristal violeta. Eles observaram que na concentração máxima de curcumina testada (40  $\mu\text{M}$ ) e com dose de 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ , ocorreu uma redução da atividade metabólica em 85%, 85% e 73% dos biofilmes formados com *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, respectivamente. Na avaliação do teste de coloração de cristal violeta, eles observaram que todas as espécies de isolados clínicos tiveram sua biomassa diminuída e também constaram que o isolado de *Candida albicans* era melhor formador de biofilmes que os isolados de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (DOVIGO et al., 2011b).

Dovigo e colaboradores (2013) realizaram experimentos *in vivo*, utilizando modelo de camundongos acometidos de candidose oral. Eles testaram como fotossensibilizador a curcumina em solução de DMSO 10%, nas concentrações de 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  e irradiada com luz LED azul (455 nm). Os animais foram inicialmente imunossuprimidos e no dia seguinte, realizada a inoculação da suspensão de *Candida albicans* ( $10^7$  UFC/mL). Após quatro dias da infecção, os

animais foram novamente imunossuprimidos de modo a garantir que a infecção permanecesse instalada. Após sete dias da aplicação do tratamento proposto, as células presentes na língua dos animais foram recuperadas com swabs e plaqueadas em meio de cultura ágar Saboraud Dextrose e incubadas a 37 °C por 48h. Os autores observaram que houve redução em todas as concentrações de curcumina utilizadas no tratamento, porém a concentração de 80 µM foi capaz de induzir a maior redução, que se deu em 4 log<sub>10</sub>. Eles também realizaram a avaliação histológica, e constataram que não houve prejuízo nos tecidos. Observaram que houve uma leve resposta inflamatória no tecido subjacente mediada por células mononucleadas, tanto nos animais considerados controle positivo (apenas infectados, mas que não receberam nenhum tipo de tratamento), quanto nos animais que receberam o tratamento com a solução de curcumina e luz. Eles puderam concluir que a curcumina associada à terapia fotodinâmica foi capaz de retroceder a infecção nos animais.

Nesse contexto, o estudo e desenvolvimento de sistemas como os precursores de cristais líquidos se mostram promissores, uma vez que esses sistemas apresentam potencial para a incorporação de fármacos lipossolúveis, como a curcumina. Além disso, a aplicação da terapia fotodinâmica ainda pode causar efeito sinérgico ao tratamento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial da utilização de sistemas precursores de cristal líquido mucoadesivos para administração bucal de curcumina, bem como verificar a associação do efeito da curcumina com o emprego da PDT no tratamento da candidose bucal, empregando estudos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar SPCL para incorporação de curcumina utilizando as técnicas de microscopia de luz polarizada, reologia, espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) e mucoadesão *in vitro*;
- Realizar ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro* da curcumina incorporada nas formulações desenvolvidas;
- Quantificar a curcumina presente na solução receptora dos compartimentos da *célula de Franz* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar a concentração inibitória mínima e avaliar a atividade *in vitro* sobre biofilme utilizando a curcumina incorporada ou não ao sistema, comparando com o antifúngico miconazol;
- Avaliar a viabilidade celular (HaCat) *in vitro* de curcumina incorporada ou não em SPCL, para a avaliação da toxicidade;
- Realizar ensaios *in vivo* em modelo murino para a avaliação da eficácia do tratamento proposto.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Matérias-primas, reagentes e soluções

Acetona P.A.-A.C.S. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Acetonitrila (J.T. Baker®, Estados Unidos);

Ácido oleico P.A. (Synth®, Brasil);

Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl AWS – Croda®, Brasil);

Água deionizada em sistema Milli Q® com condutividade  $18,2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;

Alamar Blue (Invitrogen- Thermo Fischer Scientific®);

Alça de inoculação 1  $\mu\text{L}$ , estéril (Global, Monte Alto, Brasil)

Alça de inoculação 10  $\mu\text{L}$ , estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil)

Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl AWS – Croda®, Brasil);

Cloreto de Potássio (Panreac, Diadema, SP, Brasil);

Cloreto de Sódio (Synth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Cubeta de 1,5 mL (Brand®, Germany);

Cubeta de 4,5 mL (Olen®, China);

Cultura de *Candida albicans* obtida da American Type Culture Collection (ATCC 90028);

Curcumina em pó (Sigma- Aldrich®, Estados Unidos);

Diclorometano (Sigma- Aldrich®, Estados Unidos);

Etanol PA (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Frasco coletor universal translúcido estéril 80 mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);

Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Lâminas para microscopia (Precision® Glass Line, Cotia, SP, Brasil);

Lamínulas para microscopia (Precision® Glass Line, Cotia, SP, Brasil);

Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) de alta glicose;

Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);

Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);  
Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);  
Membrana de polissulfona (Pall® Corporation, México);  
Menadiona (Sigma- Aldrich® Estados Unidos);  
Microtubos tipo Eppendorfs Graduado 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);  
Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);  
Placas de 96 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);  
Poloxamer 407 (Sigma Aldrich®, Estados Unidos);  
Ponteiras brancas para micropipeta 10 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);  
Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);  
Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);  
Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);  
Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);  
Polietilenoimina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);  
Sal de Tetrazólium (XTT - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);  
Seringas plásticas de 1,0 mL (BD®, Argentina);  
Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);  
Solução tampão HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);  
Tubos cônicos tipo Falcon de 15 e 50 mL estéreis (BD® Argentina);

#### **4.1.2. Instrumentos**

Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);  
Bico de Bunsen (J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);  
Contador de células automático/countess II FI- Life Technologies  
Bisturi (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);  
Erlenmeyer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);

Micropipeta de 0,1-10  $\mu$ L (Eppendorf, modelo Research);  
Micropipeta de 20-200  $\mu$ L (Eppendorf, modelo Research);  
Micropipeta de 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf, modelo Research);  
Micropipeta de 1-5 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);  
Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);  
Micropipeta Multicanal MultiMate<sup>®</sup>, 8 Canais, 20-200  $\mu$ L (HTL, Warsaw, Polônia);  
Pinça clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);  
Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.1.3. Equipamentos

Analisador de textura TA.XT Plus – Stable Micro Systems<sup>®</sup>;  
Agitador mecânico – Marconi<sup>®</sup>; Balança analítica – Owa labor<sup>®</sup>;  
Autoclave Vertical - Phoenix<sup>®</sup>, Araraquara;  
Balança semi-analítica – Gehaka<sup>®</sup>;  
Bio Table 450 nm – Grupo de Óptica  
Cabina de Segurança Biológica Bioseg 09<sup>®</sup> Grupo Veco;  
Câmara Incubadora com Agitação Orbital (Shaker) - Quimis<sup>®</sup>;  
Centrífuga modelo TC 6 Du Pont – Sorvall TC<sup>®</sup>;  
Centrífuga eppendorffs – Microhemato, modelo 2410, Fanem<sup>®</sup>, SP, Brasil;  
Centrífuga com refrigeração – 5810 R, Eppendorf<sup>®</sup>;  
Coluna analítica de fase reversa (Phenomenex<sup>®</sup> Ltda, São Paulo, Brasil);  
Cromatógrafo – System Agilent<sup>®</sup>;  
Espectrofotômetro - Biospectro<sup>®</sup>;  
Espectrofotômetro – EZ Read 400, Microplate Reader, Biochrom<sup>®</sup>;  
Estufa Bacteriológica TE-392/2 - Tecnal<sup>®</sup>;  
Estufa Bacteriológica – Nova Ética<sup>®</sup>;  
Câmara de fluxo laminar vertical – Modelo PA 115, 12898, Pachane<sup>®</sup>;  
Estufa de cultura de células – Modelo 002CB, Fanem<sup>®</sup>;  
Microscópio óptico - Oleman<sup>®</sup>;  
Microscópio de luz polarizada Axioskop – Zeizz<sup>®</sup>;  
Reômetro, modelo AR2000ex -TA Instruments<sup>®</sup>;

Sistema automático com célula de difusão vertical de *Franz* – Microette Plus – Hanson Research Corporation®;

Sistema de purificação de água Millipore®, Milli - Q Plus;

Ultrassom Ultra Sonic Cleaner – Unique®;

Vortex - Vixar®;

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Desenvolvimento de sistemas precursores de cristais líquidos**

#### **4.2.1.1. Preparo da dispersão de polietilenoimina**

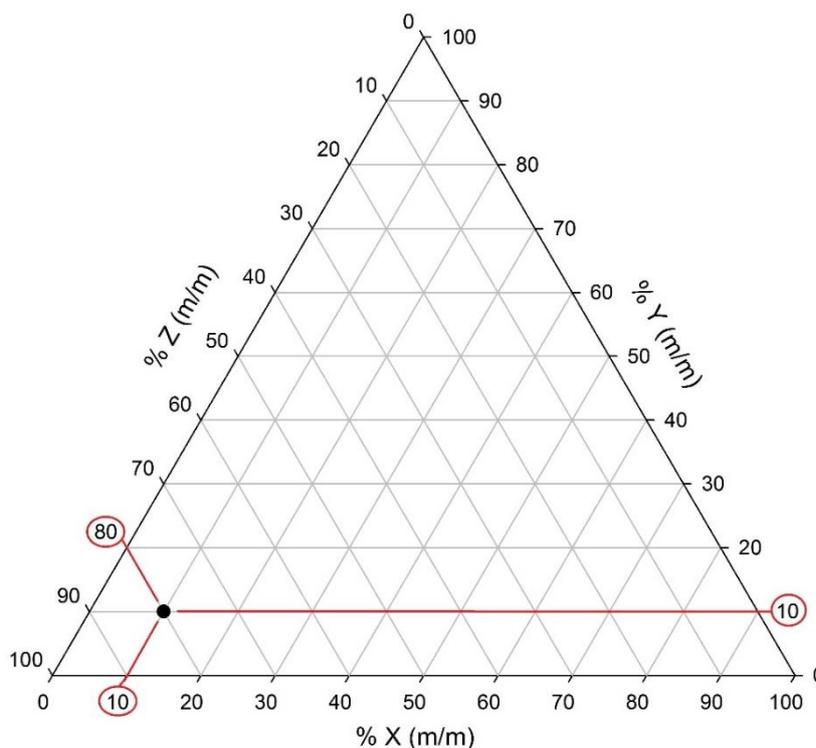
Foi preparada dispersão de polietilenoimina na concentração de 5,0% (m/m), em temperatura ambiente, adicionando o polímero em água purificada em béquer, seguido de agitação mecânica por 4 horas.

#### **4.2.1.2. Construção dos diagramas de fases**

Três diferentes diagramas de fases foram elaborados, levando o mesmo tensoativo e fase oleosa, alterando apenas a combinação de polímeros na fase aquosa. Sendo assim, todos continham ácido oleico como fase oleosa, álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS) como tensoativo e na fase aquosa foi utilizada dispersão de poloxamer 407 à 16% no sistema denominado como PLU, dispersão de polietilenoimina à 5% previamente preparada como descrito no item 4.2.1.1., no sistema designado como PEI e a união desses dois polímeros, no sistema nomeado como PP.

Para o preparo de cada diagrama, foram realizadas 36 diferentes combinações de proporções dos componentes propostos, variando de 10 a 80% (m/m), seguindo o direcionamento do esquema do diagrama, como exemplo da Figura 2, onde aponta-se como exemplo um ponto que conterà 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa (BERNEGOSSI et al., 2016; SALMAZI et al., 2015; CARVALHO et al., 2010).

**Figura 2** – Instrução para interpretação de um diagrama de fases ternário. A constituição para o ponto em destaque corresponde a 10 % de X (m/m), 10 % de Y (m/m) e 80 % de Z (m/m).



Para o preparo do sistema PLU, em temperatura ambiente, os componentes previamente pesados (m/m), de fase oleosa, tensoativo e dispersões de poloxamer 407 foram adicionados em recipientes de vidro transparentes.

De modo semelhante, o preparo do sistema PEI se deu após a união do tensoativo e fase oleosa e 10% das dispersões de polietilenoimina (5%), que foram adicionados em recipientes de vidro transparentes, completando-se o volume com quantidade suficiente de água ultrapura Milli-Q®, para atingir a proporção desejada de fase aquosa, de modo que a formulação final apresentasse a concentração de 0,5% de dispersão de polietilenoimina.

Para o preparo das formulações PP, nas mesmas condições que os dois outros sistemas anteriormente citados, primeiramente foi pesada a fase oleosa e o tensoativo, 16% de poloxamer e 10% das dispersões de polietilenoimina (5%) completando-se com água, quando foram necessários.

Posteriormente, todos os frascos foram levados para agitação manual, com espátula de aço inox, e em seguida, levados ao agitador magnético a 250 rpm, até completa homogeneização, durante 20 – 24 horas, em temperatura ambiente.

Em seguida, as formulações permaneceram em repouso durante 24 horas, e posteriormente foram visualmente classificadas em separação de fases, sistemas líquidos ou viscosos opacos, translúcidos ou transparentes (CHORILLI et al., 2009) e desse modo, delimitado as diferentes regiões dos sistemas obtidos. Logo, após essa classificação e determinação, foram selecionados os sistemas de interesse para o trabalho em questão – os quais se apresentaram na região de microemulsões com potencial transição e reestruturação após adição de fase aquosa - para posterior caracterização físico-química.

#### **4.2.2. Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP)**

Todas as formulações foram avaliadas em microscópio de luz polarizada. Para o preparo das amostras, utilizou-se uma lâmina de vidro com uma gota da formulação a ser analisada e recoberta com uma lamínula. Para a captação das imagens, foi acoplada uma câmera Fujifilm® com a lente de aumento de 40 vezes. As amostras foram avaliadas em temperatura ambiente.

#### **4.2.3. Seleção dos sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL)**

Selecionou-se uma formulação de cada diagrama, considerando-se alguns critérios, como baixa viscosidade e organização estrutural com diluição aquosa e mantendo-se fixa a concentração da fase aquosa (10%), oleosa (30%) e tensoativo (60%) (Tabela 1). Para observação do efeito da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionado, foram adicionados 30, 50 e 100% (m/m) da saliva artificial nas formulações selecionadas. A composição da saliva artificial utilizada foi de 8 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 0,19 g/L de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2,38 g/L de fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) com pH 6,8 (MARQUES et al., 2011; SALMAZI et al., 2015).

**Tabela 1** - Composição das formulações selecionadas à serem caracterizadas dos diagramas previamente construídos.

Formulação	(%) m/m				
	Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	Ácido Oleico	Dispersão polietilenoimina 0,50%	Dispersão de poloxamer 16%	Dispersão de polietilenoimina 0,50% e poloxamer 16%
<b>PEI</b>	30	60	10	-	-
<b>PLU</b>	30	60	-	10	-
<b>PP</b>	30	60	10	-	10

#### 4.2.4. Incorporação da curcumina nos sistemas selecionados

A incorporação da curcumina na concentração de 80  $\mu\text{M}$  foi realizada na fase oleosa dos sistemas até sua total solubilização (aproximadamente 30 minutos), sob agitação com barras magnéticas (5 x 15 mm), em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Em seguida, os outros componentes foram adicionados e homogeneizados. A concentração de curcumina utilizada foi baseada em dados obtidos na literatura, a qual foi efetiva frente aos biofilmes de *Candida albicans* (DOVIGO et al., 2013).

#### 4.2.5. Caracterização físico-química dos sistemas

##### 4.2.5.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Para a realização das medidas de SAXS, as amostras foram preparadas e analisadas após 24h. Esse ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Brasil) na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra, um monocromador ( $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$ ) e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento  $I(q)$ , em função do vetor de espalhamento,  $q$ . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Os espectros foram coletados durante 45 segundos cada (MANAIA, 2012; BERNEGOSSI et al., 2016).

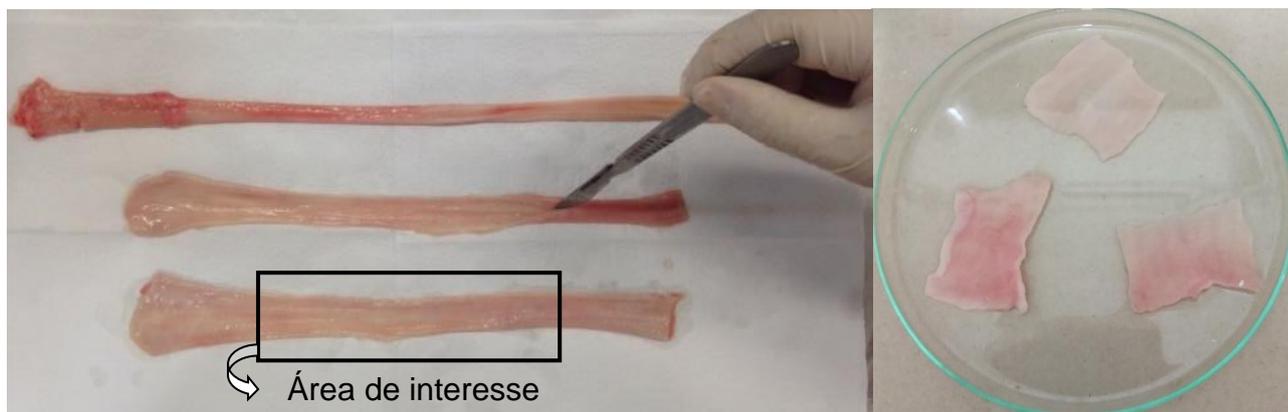
#### 4.2.5.2. Análise reológica contínua

A análise reológica de fluxo contínuo foi realizada no Laboratório de Física I - Engenharia Química, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química da UNESP - Araraquara. As amostras com e sem curcumina foram avaliadas empregando reômetro AR2000ex (TA Instruments®) no modo *fluency* (flow) e, de acordo com a consistência de cada formulação, foram selecionadas as geometrias (cone/placa ou placa/placa). As formulações foram colocadas na base inferior do reômetro e esperou-se três minutos para adaptação da amostra na temperatura desejada (37 °C). Para a curva ascendente foi utilizada a taxa de cisalhamento de 0 a 100 s<sup>-1</sup> e para a curva descendente, de 100 a 0 s<sup>-1</sup>. Este teste foi realizado em quintuplicata (BERNEGOSSI et al., 2016; CARVALHO et al., 2013).

#### 4.2.5.3. Força mucoadesiva *in vitro*

Para a avaliação da força mucoadesiva *in vitro* foi utilizado analisador de textura TAXT plus. Foram empregadas mucosas de esôfago de suínos não escaldadas obtidas do Frigorífico Olhos d'água (Ipuã - SP). O método para a manipulação das mucosas foi adaptado de Mazzarino e colaboradores (2015). As mucosas esofágicas foram isoladas utilizando bisturi e em seguida lavadas com soro fisiológico (Figura 3). Após esse procedimento, as extremidades espessas das mucosas foram descartadas. Em seguida, foram seccionadas em tamanhos de aproximadamente 5x5cm e mantidas a uma temperatura de -10 °C até o momento de uso.

**Figura 3** - Foto do preparo das mucosas esofágicas.



As mucosas foram afixadas na sonda analítica cilíndrica com o auxílio de elásticos de borracha, de modo que a superfície da mucosa não apresentasse enrugamentos e/ou sobras. Após, a mucosa foi umedecida com saliva artificial durante 5 segundos e em seguida, retirado o excesso. Aproximadamente 5g de das amostras foram previamente centrifugadas (1400g, 4 min.) acondicionadas em recipientes de vidro, permanecendo em banho-maria em uma temperatura de 37 °C durante a análise. Após a sonda envolta pela membrana esofágica, esta desceu até encostar na superfície da formulação (velocidade de constante de 1 mm/s), a mesma foi introduzida 0,5 mm de profundidade, permanecendo em contato com a formulação em análise durante 60 segundos (velocidade de retorno da sonda 0,5 mm/s). A força máxima necessária para que a mucosa se destacasse da amostra foi observada. Esta análise foi realizada com n= 10.

#### **4.2.5.4. Avaliação da liberação *in vitro* da curcumina**

O estudo da liberação *in vitro* foi feito em células de Franz (Microette Plus) com capacidade interna de 7 mL. Foi utilizada como solução receptora tampão fosfato (pH 6,8) acrescido de 1% de polissorbato 80 (v/v), 15% de propilenoglicol (1,2-propanediol) (v/v) e 5% etanol absoluto grau para CLAE (v/v) (GONÇALEZ, 2015; KOOP et al., 2015), garantindo a condição *sink* durante todo o ensaio. A solução receptora após preparada foi filtrada em sistema a vácuo e levada ao ultrassom (Ultra Sonic Cleaner – Unique®) para a retirada de possíveis bolhas.

Foram utilizadas membranas sintéticas de polissulfona com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ , 25 mm de diâmetro e espessura média de 145  $\mu\text{m}$ , de modo que estas foram dispostas sobre as células de *Franz* previamente ambientalizadas em solução receptora, de maneira que impedisse a formação de bolhas. Em seguida, foi colocado o anel dosador (com área de 1,77  $\text{cm}^2$ ) e as amostras (aproximadamente 300 mg) foram adicionadas sobre as membranas sintéticas. A concentração de curcumina nas amostras analisadas foi 10 vezes maior que a concentração selecionada para os demais ensaios de caracterização, ou seja, 800  $\mu\text{M}$ . Esse aumento foi realizado para que fosse possível a quantificação da curcumina após a sequência de diluições realizadas durante todo o experimento. O ensaio foi mantido sob agitação de 300 rpm e a temperatura utilizada foi de  $37 \pm 1$  °C. Nos tempos pré-determinados (5 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h e 24h) foram coletadas alíquotas de 1,5 mL das células de *Franz* e imediatamente o meio foi repostado com mesmo volume de solução receptora. Em seguida, as alíquotas foram levadas imediatamente para serem injetadas em CLAE. Neste teste, foi avaliada a curcumina (800  $\mu\text{M}$ ) solubilizada em meio receptor como controle. As análises foram realizadas em  $n=3$ .

#### **4.2.5.5. Avaliação da permeação *ex vivo***

##### **4.2.5.5.1. Teste de permeação *ex vivo* utilizando célula de difusão tipo *Franz***

De maneira semelhante ao experimento anterior, descrito no item 4.2.5.4, neste teste também foi utilizado o permeador com células de *Franz* (Microette Plus), porém substituindo a membrana sintética por membranas esofágicas suínas. As mucosas esofágicas suínas, de acordo com a literatura, melhor mimetizam a mucosa da cavidade oral humana (MAZZARINO et al. 2015). A solução receptora utilizada foi composta de solução tampão fosfato (pH 7,4) contendo 1% de polissorbato 80 (v/v), 15% de propilenoglicol (1,2-propanediol) (v/v) e 5% etanol absoluto grau para CLAE (v/v) (GONÇALEZ, 2015; KOOP et al., 2015), a qual foi adicionada no béquer jaquetado do sistema de célula de difusão vertical (Microette Plus). Previamente, as membranas esofágicas suínas foram acondicionadas em solução fisiológica à 0,9%, durante aproximadamente 20

minutos e com o auxílio de uma pinça, transferidas sobre as 6 células de *Franz* com o lado externo da mucosa para cima, conforme Figura 4.

**Figura 4** - Imagem de uma célula de *Franz* no preparo para o ensaio de permeação e retenção.



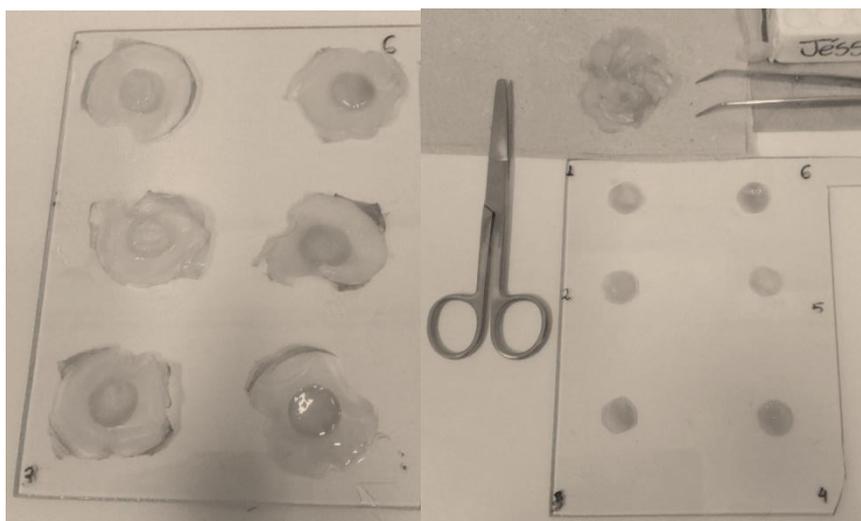
Posteriormente as membranas esofágicas foram presas com anel dosador e presilhas. Sobre as membranas presas, adicionou-se na área de 1,77cm<sup>2</sup> disponível no interior do anel dosador, cerca de 300 mg de amostra contendo curcumina. As amostras líquidas foram acondicionadas em dispositivos de copos. Os compartimentos internos das *células de Franz* foram agitados constantemente a 300 rpm, onde circulava a solução receptora à 37 ± 1 °C. O equipamento foi programado para realizar coletas em 10 tempos pré-determinados (5 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h e 24h). As amostras coletadas foram imediatamente filtradas em filtros de seringa PTFE de 0,45 µm e injetadas em CLAE para construção de um gráfico de concentração permeada em função do tempo. As formulações analisadas foram comparadas com uma solução de curcumina em solução receptora como controle. A concentração de curcumina em todas as amostras foi de 800 µM.

#### **4.2.5.5.2. Teste de retenção *ex vivo***

Após o ensaio de permeação, as membranas esofágicas suínas foram retiradas do equipamento e colocadas em uma placa de vidro ao abrigo de luz.

Em seguida, foram preparadas para a realização da retenção, iniciando com a cautelosa remoção do excesso de formulação sobre as peles, utilizando papel fino e absorvente. Em seguida, a área que a formulação estava em contato com a pele foi recortada (Figura 5) e fragmentadas, utilizando uma tesoura cirúrgica. Logo após, ainda ao abrigo de luz, a pele foi colocada em tubos de ensaio contendo 2 mL de acetonitrila e triturada em ultraturrax, os quais foram agitados em vortex por 2 minutos, sonicados em banho de ultrassom (Ultra Sonic Cleaner – Unique®); durante 30 minutos e centrifugados durante sete minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi então filtrado e analisado em CLAE para quantificação da curcumina retida.

**Figura 5** - Foto da preparação das membranas esofágicas no teste de retenção.



#### 4.2.5.5.3. Método analítico para quantificação da curcumina

O método utilizado para quantificação da curcumina foi validado anteriormente por Fonseca-Santos e colaboradores (2016), em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Varian®, com detector espectrofotométrico ProStar®-330-UV-VIS-PDA e Rheodine-VC-125, com auto mostrador, Varian- ProStar® modelo 410 e injeção automática de 20 µL. A coluna cromatográfica utilizada foi C18 de 250 mm x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm.

A proporção de fase móvel (água acidificada contendo 2% de ácido acético:acetonitrila) foi de 50:50, fluxo de fase móvel de 1,2 mL por minuto, comprimento de detecção no UV de 425 nm e temperatura do forno de 33 °C.

Foi construída uma curva analítica utilizando 8 pontos entre as concentrações de 0,5-15 µg/mL de curcumina em acetonitrila. As soluções foram injetadas no cromatógrafo e os valores obtidos da área sob a curva foram aplicados na equação da curva analítica.

#### **4.2.6. Fotodegradação da curcumina por UV**

Este ensaio foi realizado no Instituto de Física de São Carlos, no Centro de Ótica e Fotônica, na Universidade Estadual de São Paulo. As medidas foram efetuadas em espectrofotômetro de leitor de placas, Termo Scientific, Multiskan™ GO no comprimento de onda de 570 nm. As amostras utilizadas foram DMSO, PEI-0%, PLU-0% e PP-0% sem e com a incorporação de curcumina 80 µM. Foram adicionados 100 µL de cada formulação em poços de placa de poliestireno (n=6). As amostras foram aferidas antes e após a irradiação em tempos pré-determinados como descritos na Tabela 2, juntamente com a dose (J/cm<sup>2</sup>) a que correspondem. Foram integradas as curvas de absorção utilizando o software Microcal Origin 7.5 TM.

**Tabela 2** - Tempos pré-determinados de irradiação das amostras de DMSO, PEI-0%, PLU-0% e PP-0% sem e com a incorporação de curcumina 80  $\mu\text{M}$  e as respectivas doses de luz ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Tempos de irradiação (min)	Dose de luz ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )
1	2,01
2	4,02
3	6,04
4	8,06
5	10,07
8	16,12
10	20,15
20	40,30
30	60,44

#### 4.2.6.1. Medida de Fluorescência

A fluorescência induzida com excitação em 405 nm foi mensurada no espectrofluorímetro HITACHI F-4500. A emissão das amostras de DMSO, PEI, PLU e PP sem e com a incorporação de curcumina 80  $\mu\text{M}$  foi coletada em 500 nm. Da mesma maneira como realizada no estudo de fotodegradação da curcumina por UV, as amostras foram aferidas antes e após a irradiação em tempos pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5,8, 10, 20 e 30 minutos).

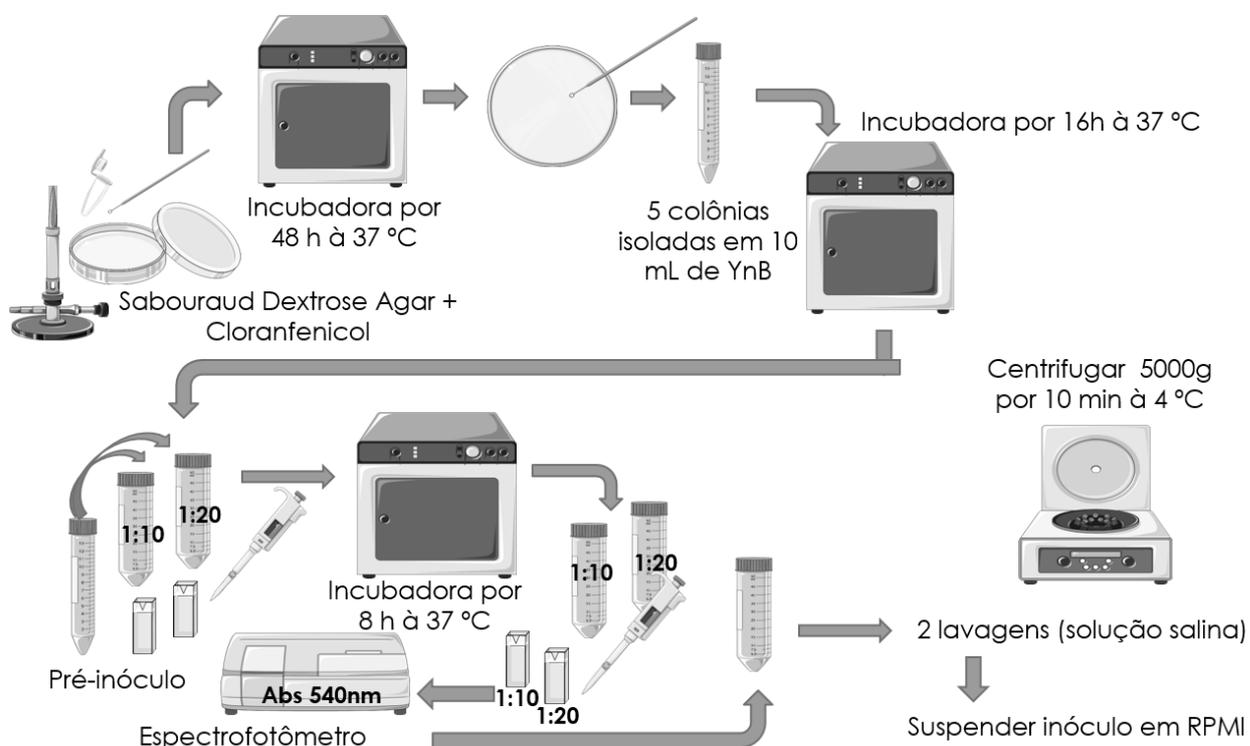
#### 4.2.7. Testes microbiológicos *in vitro*

##### 4.2.7.1. Pré-inóculo e inóculo

Os ensaios microbiológicos *in vitro* foram realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara, no Laboratório de Microbiologia Aplicada. Todas as etapas descritas a seguir, foram realizadas assepticamente. Para o preparo do pré-inóculo, cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 90028 foi mantida congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do experimento. Para reativação, foi inoculado 1  $\mu\text{L}$  em placa de cultura

com meio específico Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol (0,01%), utilizando a técnica por esgotamento e em seguida, incubada a 37 °C por 48 horas. Com o auxílio de uma alça de inoculação descartável estéril, foram transferidas cinco colônias isoladas para um tubo cônico contendo 10 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) estéril e levado para o vortex durante 15 segundos e, posteriormente, incubado a 37 °C por 16-18h com a tampa entreaberta. Após o período de incubação, foi preparada uma lâmina com uma alíquota do pré-inóculo e observada em microscópio óptico, para certificação de ausência de contaminação. Logo, foram realizadas duas diluições do pré-inóculo obtido (1:10 e 1:20) para a obtenção de um inóculo. Foi realizada a verificação da densidade óptica em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540 nm. O valor da densidade óptica no tempo 0h foi registrado e, posteriormente, subtraído da leitura subsequente, realizada após 8h de incubação do inóculo à 37°C, em estufa bacteriológica estática. Como referência foram usados os dados da curva de crescimento do microrganismo em estudo, para determinação do meio da fase de crescimento exponencial (*fase mid-log*), foi escolhido o inóculo com a DO entre 0,52-0,56, correspondente à concentração de  $10^7$  UFC/mL para a formação de biofilmes. Após a padronização do inóculo, foram realizadas duas lavagens com solução salina 0,85% e centrifugação a 5000g durante 10 minutos, a 4°C. A seguir, na Figura 6 está representado em forma de esquema ilustrativo todo o processo descrito.

**Figura 6** - Esquema dos procedimentos realizados para obtenção do pré-inóculo e inóculo.



#### 4.2.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da curcumina no sistema desenvolvido

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo o documento M27A3 da *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2008, com modificações (SALMAZI et al., 2015). Em cada orifício das microplacas (96 poços) foi acrescentado meio de cultura Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640, ajustado ao pH 7,0 com tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico) e esterilizado por membrana filtrante 0,22  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  da solução de curcumina em DMSO à 10%, PP-CUR-0% e miconazol em 10% de DMSO e realizada a diluição seriada. Em seguida foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  da suspensão do microrganismo em cada orifício das microplacas, de modo as concentrações finais das amostras com curcumina testadas foram de 4,88 a 625  $\mu\text{g/mL}$  (solução e formulação) e do controle negativo miconazol, de 6,9 a 780

µg/mL. Esse procedimento foi realizado em duas placas diferentes, de forma que uma foi a placa escura e a outra a placa PDT. Também foi realizado o controle do meio de cultura estéril e controle positivo (crescimento de *Candida albicans*). As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica à 37°C por 48 horas. Em seguida, a placa PDT com todas as amostras acondicionadas foi irradiada com LED azul durante dez minutos (dose 10,07 J/cm<sup>2</sup>), enquanto a placa escura permaneceu reservada ao abrigo de luz (SALMAZI et al., 2015).

#### **4.2.7.2.1. Leitura com revelador cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio**

Após o término da incubação foram adicionados 20 µL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC), e incubação a 37°C por três horas. A inativação do crescimento da levedura mantém as soluções dos poços intactos, contudo a coloração avermelhada aponta sua proliferação (DUARTE et al., 2005).

#### **4.2.7.3. Formação de biofilmes**

Em 2 placas de 96 poços com fundo chato, foram transferidos 150 µL do inóculo (em meio de cultura RPMI) em cada poço e incubadas por 90 minutos, referente ao período de adesão (CHANDRA et al, 2001). Em seguida, o meio de cultura foi retirado, e cada poço lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS do Inglês *Phosphate-buffered saline*) pH 7,3, estéril, e após a lavagem, adicionou-se 150 µL de meio de cultura líquido estéril. A placa foi incubada por 48 horas, onde após 24 horas houve a renovação de 75 µL de meio (ANDRADE et al, 2013).

#### **4.2.7.3.1. Tratamento do biofilme**

Após os biofilmes serem cultivados nas placas, as mesmas foram nomeadas como placa 1: escura e placa 2: PDT. Ambas tiveram todo meio de cultura retirado dos poços, lavadas duas vezes com PBS e, posteriormente, ao abrigo de luz, os poços contendo os biofilmes formados receberam 150 µL, em triplicata, dos seguintes tratamentos: formulação PP-0% com curcumina 80 µM, formulação sem curcumina, solução em DMSO 10% curcumina 80 µM, e PBS estéril, como controle. Após 20 minutos, tempo de pré-irradiação, a placa 2 foi irradiada com LED durante 10 minutos (dose 10,07 J/cm<sup>2</sup>). Em seguida, todo conteúdo dos poços de ambas as placas foram retirados. Todos os poços foram lavados duas vezes com PBS e adicionados 100 µL de solução salina estéril a qual foi coletada por mini swabs estéreis, realizando movimentos circulares para a total retirada do biofilme pós-tratamento. Logo em seguida, os swabs foram transferidos para microtubos contendo 900 µL de solução salina, e agitados em vórtex durante 30 segundos para o desprendimento das células, com posteriores diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>). Alíquotas das diluições foram plaqueadas em placas de Petri contendo SDA com cloranfenicol. Após 24 horas de incubação a 37 °C, realizou-se a contagem das colônias crescidas nas placas e foi calculado o número de UFC/mL.

#### **4.2.7.5. Ensaio para quantificação da atividade metabólica (XTT)**

Após o preparo do pré-inóculo e inóculo como descrito no item 4.2.7.1., foram realizadas duas lavagens com solução salina 0,85%, em seguida, ressuspensa em solução salina e transferido 100 µL para placas de 96 poços estéreis, e incubado em shaker a 37°C por duas horas a 80 rpm, para que houvesse a adesão do biofilme. Após esse período, foi retirado todo o sobrenadante com muita cautela, de modo que assegurasse a permanência do biofilme. Foram adicionados 100 µL de meio RPMI em cada poço, com posterior incubação em shaker a 37°C durante 48h. Contudo, após 24h foi realizada a renovação do meio de cultura. Em seguida, foi removido o sobrenadante e lavado com 200 µL de salina, cuidadosamente, e realizada a aplicação dos tratamentos,

com posterior incubação em shaker a 37°C por 24h. Ressalta-se que os tratamentos testados foram preparados previamente em microtubos de 2 mL, estéreis, de modo que foram compostos por 500 µL de meio de cultura RPMI estéreis e 500 µL dos tratamentos, os quais foram: formulação PP-CUR-0%, PP-0%, miconazol em DMSO 10%, curcumina em DMSO 10% e a solução de DMSO 10%. Destaca-se que as formulações PP-CUR-0%, PP-0% foram selecionadas pois após avaliação dos resultados dos testes de caracterização, foram as que apresentaram melhor mucoadesividade. Tais amostras foram preparadas apenas em condições assépticas.

Posteriormente, foram adicionados aos poços, ainda com as amostras incubadas, 200 µL de solução de XTT e incubado por mais três horas. Finalizado o tempo de incubação, ao abrigo de luz, foram transferidos 150 µL para microtubos e levados à centrifugação por 20 minutos a 10000 rpm. Em seguida, 100 µL do sobrenadante de cada amostra centrifugada foram transferidos para uma placa estéril e levada para leitura a 492 nm em espectrofotômetro, onde foram coletadas as absorbâncias de cada poço (DE FOGGI et al. 2016; DOS SANTOS RAMOS et al., 2015).

#### **4.2.7.6. Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos por intermédio do revelador de crescimento Alamar Blue**

A avaliação do efeito citotóxico da formulação com e sem a incorporação de curcumina (PP-0% e PP-CUR-0%) foi analisada em células do tipo queratinócitos saudáveis (HaCat), no Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Brasil.

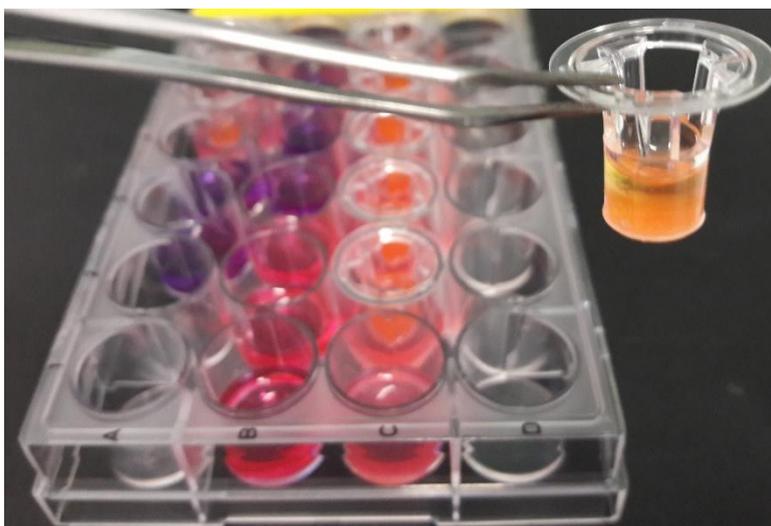
Para a detecção do dano celular, o corante Alamar Blue foi utilizado por sua capacidade de alteração de cor para azul (NOCIARI et al., 1998).

Foram cultivadas em placas de poliestireno estéreis com 24 poços (100000 células/poço), em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) de alta glicose, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina, 100 mg/mL e estreptomina, e 2 mmol/L de glutamina, durante 24-48 horas, à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, até que atingisse a confluência 80%.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS e todo meio de cultura foi substituído por 800  $\mu\text{L}$  de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de Alamar Blue. As formulações a serem testadas (200  $\mu\text{L}$  de PP-0%, PP-CUR-0%, CM, CV) foram adicionadas no interior de dispositivos Transwell® (10  $\mu\text{m}$ ), os quais posteriormente foram transferidos para o interior dos poços para a realização do experimento (Figura 7). Neste experimento a concentração de curcumina incorporada na formulação PP-0% foi de 80  $\mu\text{g/mL}$ , conforme resultados obtidos na determinação da CIM. Para efeito e comparação foi utilizado como controle de morte (células inviáveis), o Triton X-100 à 9% e o controle vivo, apenas meio de cultura com Alamar Blue. Ressalta-se que também foram realizados os brancos de todos os grupos experimentais, de modo a descontar do valor final obtido.

A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48h que as formulações entraram em contato com as células. A fluorescência foi mensurada utilizando um fluorímetro de microplacas (Fluoroskan, Lab Systems) em 544 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os ensaios foram realizados em três dias diferentes ( $n=9$ ).

**Figura 7** - Imagem do dispositivo Transwell® para inserção das amostras em contato com as células cultivadas em placa de 24 poços.



#### **4.2.8. Testes microbiológicos *in vivo***

Foram utilizados 101 camundongos *Swiss* fêmeas, livre de patógenos, entre 20-25 g, nos experimentos descritos abaixo. Os animais foram alocados por randomização em grupos experimentais antes de cada experimento. A sala foi mantida com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com alimentação e água à vontade. O projeto e protocolo de pesquisa deste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (23/2017). Os camundongos, com aproximadamente 6 semanas de vida, foram provenientes do Biotério de Botucatu (UNESP). Os animais foram protegidos em mini-isoladores individuais, e alimentados com ração triturada e úmida e água *ad libitum*. Previamente aos experimentos, foi analisada a presença de leveduras do gênero *Candida* na língua de todos os animais, por intermédio de coleta realizada com swab estéril umedecido em solução salina e friccionado sobre a língua de cada animal (CARMELLO et al., 2016).

##### **4.2.8.1. Cultivo do microrganismo e obtenção da suspensão celular**

Para a indução da candidose oral nos camundongos, foi utilizada a cepa de referência *Candida albicans* ATCC 90028 (Rockville, MD). A cepa foi descongelada e reativada em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Após, a cultura foi reativada em tubos com 5 mL de RPMI 1640 a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 horas, sob agitação em shaker, à 150 rpm. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm x 10 min e lavados em solução salina estéril e ressuspensas no mesmo volume, novamente em solução salina estéril, a concentração final da suspensão foi de  $10^7$  células/mL (CARMELLO et al., 2016).

##### **4.2.8.2. Indução de candidose em língua de camundongos**

Para indução da candidose bucal nos animais, foi utilizada uma metodologia já descrita na literatura (CARMELLO et al., 2016). Os autores averiguaram os requisitos necessários para se estabelecer em camundongos a

candidose bucal, e nesse estudo eles observaram macroscopicamente no dorso das línguas dos animais a presença de lesões brancas e pseudomembranas, típicas da doença.

Para isso, os animais foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de metilprednisolona, na dose de 100 mg/kg de massa corporal, nos dias 1, 5, 9 e 13 do experimento. Foram utilizadas seringas de insulina descartáveis (Bd Ultra-Fine) com agulha 0,3 x 8 mm, para todas as administrações injetáveis. Tetraciclina (0,83 mg/mL) foi administrada na água disponibilizada aos animais, durante todo período experimental. No dia 2, os animais foram sedados com uma injeção intramuscular de 50 µL de cloridrato de clorpromazina 0,1 mg/mL em cada fêmur e em seguida foram inoculados com a suspensão fúngica na concentração de  $10^7$  UFC/mL. Para isso swabs estéreis foram embebidos nas soluções e passados sobre o dorso da língua dos animais por 30 segundos.

#### **4.2.8.3. Tratamento e avaliação microbiológica**

No sétimo dia, a infecção foi verificada por inspeção visual e os animais foram divididos aleatoriamente em grupos. Os tratamentos foram realizados diariamente do dia 7 ao 11. Para isso, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina na concentração de 100 mg/Kg do peso corporal do animal e xilazina 10 mg/Kg do peso corporal.

Protocolo F+L+: Vinte e quatro animais pertenceram a esse grupo e foram submetidos a PDT. As línguas dos animais foram cuidadosamente levadas para fora da cavidade bucal do animal para a aplicação de 50 µL da curcumina incorporada em sistema precursor de cristal líquido mucoadesivo à 1250 µg/mL (PP-CUR-0%). Destaca-se que os procedimentos foram realizados ao abrigo de luz, uma vez que a curcumina é um ativo fotossensível.

Os animais permanecem em ambiente escuro durante 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Depois desse período, as línguas dos animais foram expostas a luz LED por 70 segundos resultando em uma dose de 10,07 J/cm<sup>2</sup> (Grupo F+L+).

Protocolo F+L-: Vinte e quatro animais pertenceram a esse protocolo. As línguas dos animais foram cuidadosamente levadas para fora da cavidade bucal

do animal para a aplicação de 50 µL da curcumina incorporada em sistema precursor de cristal líquido mucoadesivo à 1250 µg/mL. Neste grupo, os animais receberam tratamento apenas com a curcumina, sem irradiação. Então, animais permaneceram com a curcumina em contato com a superfície lingual por 20 min e 70 segundos, em ambiente sem qualquer iluminação.

Protocolo F-L-: Vinte e quatro animais pertenceram a esse protocolo. Não receberam nenhum tratamento. Grupo considerado controle positivo.

Protocolo Nis: Vinte e quatro animais pertenceram a esse protocolo. Os animais receberam tratamento com 50 µL de Nistatina 100000 UI/mL, uma vez ao dia, durante cinco dias. O fármaco foi adquirido comercialmente, produzido pelo Laboratório Farmacêutico Neo Química®. A Nistatina tem sido amplamente utilizada para o tratamento de candidose oral, servindo como tratamento padrão para comparação.

Protocolo CN: Cinco animais não inoculados pertenceram a esse grupo. Os animais deste grupo não receberam inoculação de *Candida albicans* e nenhum tratamento. Grupo considerado controle negativo; animais saudáveis.

Os protocolos de tratamentos foram aplicados diariamente (do sétimo ao décimo primeiro). Em seguida, a avaliação microbiológica por esfregaço, a avaliação macroscópica e a remoção da língua para análise histopatológica foram realizadas vinte e quatro horas e sete dias após o término dos tratamentos (décimo segundo e décimo oitavo dia).

Assim, os animais submetidos a cada um dos protocolos F+L+, F+L-, F-L- e Nis foram aleatoriamente divididos em dois grupos (24h e 7d, os quais foram avaliados após, 24 horas e 7 dias ao último tratamento, respectivamente), de acordo com o período de avaliação (dia 12 ou dia 18). A tabela 3 descreve os grupos avaliados.

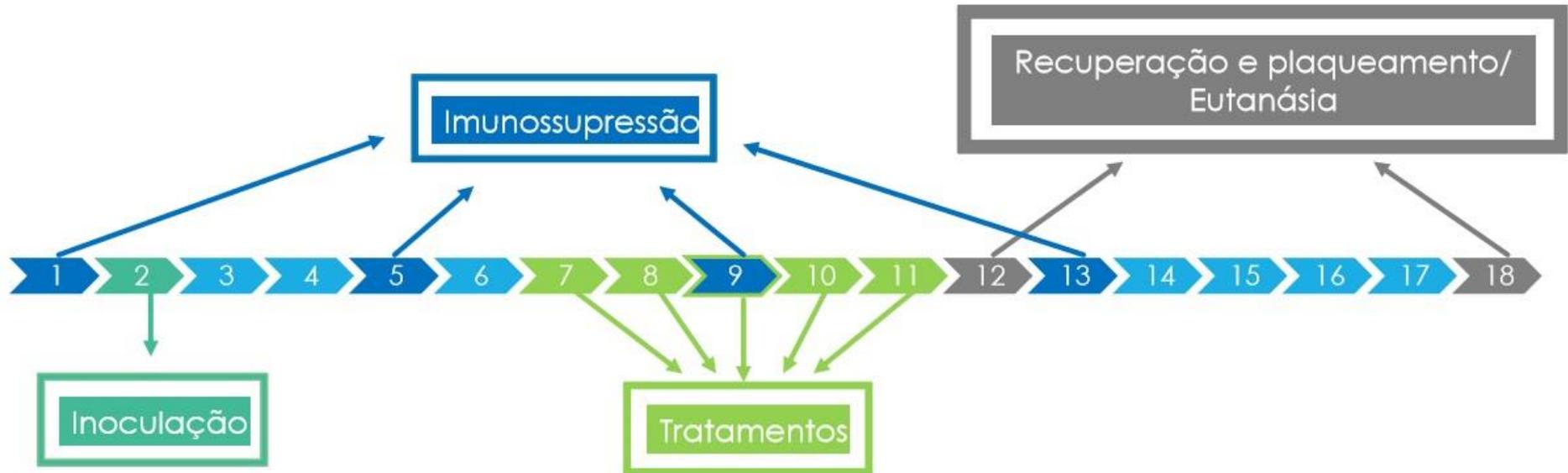
**Tabela 3-** Descrição do número de animais em cada grupo avaliado, na avaliação do sistema PP-CUR-0% no tratamento da candidose bucal.

Quantidade de animais utilizados por grupo na pesquisa	n=12 para os grupos: F+L+ 24h; F+L- 24h; F-L- 24h; Nis 24h; F+L+ 7d; F+L- 7d; F-L- 7d; Nis 7d; n=5 para o grupo CN
Total de grupos	9
Total de animais	101

Os animais do grupo CN foram avaliados somente no dia 12, ou seja, vinte e quatro horas após o último tratamento. As lesões na língua dos animais foram avaliadas antes do início dos tratamentos propostos e após 24 horas e 7 dias da última aplicação (análise macroscópica das lesões de candidose).

As línguas foram cuidadosamente esfregadas por 1 minuto com cotonete estéril (análise microscópica). Os cotonetes foram então transferidos para tubos contendo 1 mL de solução salina e agitados em vórtex por 1 minuto para retirada as células de *Candida albicans*. Após, foram feitas diluições em série a partir das amostras contidas nos tubos e plaqueadas em duplicata sobre meio de cultura SDA com 0,01% de cloranfenicol. Após 48 horas de incubação à 37 °C, as colônias viáveis foram contadas e os valores de UFC/mL foram determinados. Os animais foram eutanasiados 24 horas (dia 12) ou 7 dias (dia 18) após a última aplicação dos tratamentos propostos, por meio de injeção intramuscular na região femoral, com dose de ketamina (200 mg/kg) e xilazina 10 mg/Kg do peso corporal. Após a eutanásia, a língua de cada animal foi removida cirurgicamente e foram realizados cortes transversais para realização da análise histológica. A Figura 8 mostra os dias em que os procedimentos foram realizados, para melhor entendimento.

**Figura 8** – Esquema cronológico dos procedimentos de inoculação, imunossupressão, tratamentos, recuperação com posterior plaqueamento das células de *Candida albicans* inoculadas nas línguas dos animais e eutanásia, do experimento realizado em camundongos *Swiss mice*.



(Fonte: adaptado de SAKIMA, 2017).

#### 4.2.8.4. Análise histológica

Logo depois da fixação em formol à 10%, as línguas foram seccionadas em série de seis micrômetros de espessura (amostras previamente tratadas com parafina, montadas em lâminas de vidro e coradas com reagente ácido periódico de Schiff e também com hematoxilina-eosina). As lâminas foram examinadas sob microscópio de luz com ampliação de 36, 125 e 250 vezes. Foram avaliadas quatro lâminas de vidro por amostra. As alterações histológicas foram avaliadas quanto a presença de células inflamatórias, modificação das células presentes no tecido conjuntivo, epitelial e substância fibrosa intercelular. A avaliação foi realizada por um único examinador cego para cada grupo experimental de acordo com os diferentes intervalos de tempo em estudo.

#### 4.3. Análises estatísticas

Os dados da força de mucoadesão *in vitro* tiveram o pressuposto de normalidade atendido em 11 grupos ( $p \geq 0,067$ ) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e os dados apresentaram heterocedasticidade de acordo com o teste de Levene ( $p < 0,001$ ). Optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, com correção de Welch. Assim, os dados foram submetidos à Análise de Variância a dois critérios (Formulação e Saliva), seguida do pós-teste de Games Howell. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Os testes de liberação e permeação *in vitro* foram estatisticamente analisados utilizando o teste ANOVA de um critério com pós teste de *Tukey* usado para comparar as médias entre os grupos ( $\alpha = 0,05$ ).

Para o ensaio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e no ensaio de avaliação da viabilidade celular foram os resultados avaliados pela ANOVA a um fator com correção de Welch, seguida do pós-teste de Games Howell ( $\alpha = 0,05$ ).

Testes microbiológicos *in vivo* tiveram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade checados. Os outros grupos mostraram distribuição normal ( $p \geq 0,149$ ), com exceção do grupo NIS ( $p = 0,040$ ) que teve sua decisão próxima do

limiar de significância. A homocedasticidade foi verificada com o teste de Levene ( $p=0,382$ ). Assim, os dados foram submetidos a ANOVA a um fator e pós-teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

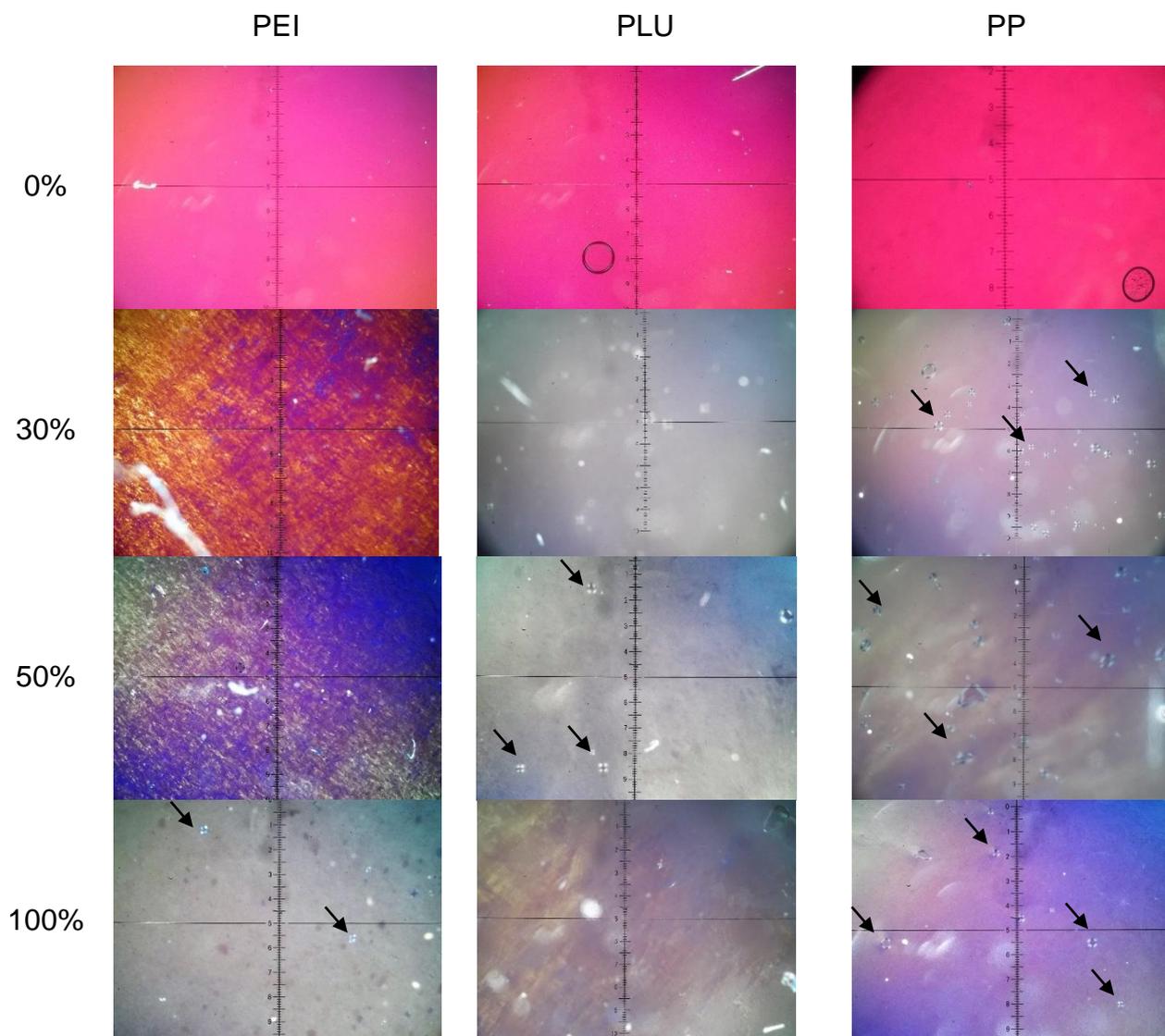
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Caracterização físico-química**

#### **5.1.1. Microscopia de luz polarizada**

As 108 formulações foram observadas em plano de luz polarizada, objetivando analisar a estruturação organizacional dessas amostras. As fotomicrografias dos sistemas selecionados podem ser observadas na Figura 9. Foi possível verificar a presença de campo escuro, indicativo de microemulsões, e a presença de estruturas semelhantes a cruces-de-malta e estrias, indicativas de fase lamelar e hexagonal.

**Figura 9** - Fotomicrografias dos sistemas PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PP-0%, PP-30%, PP-50% e PP-100% sob microscópio de luz polarizada.



As setas apontam cruzes-de-malta nas imagens, as quais são indicativas de sistema de cristal líquido de mesofase lamelar. PEI: Formulação contendo Polietilenoimina 0,5%; PLU: Formulação contendo Pluronic® 16%; PP: Formulação contendo Polietilenoimina 0,5% e Pluronic® 16%.

Como pode-se observar, a formulação PEI, sem adição de saliva artificial, foi classificada como isotrópica, ou seja, a amostra não foi capaz de ocasionar desvio da luz polarizada, o que indica fortemente a formação de um sistema microemulsionado, corroborando com a avaliação macroscópica realizada anteriormente. Após a adição da saliva artificial, foram visualizadas estrias nas amostras PEI-30% e PEI-50%, indicativas de mesofases hexagonais. Na amostra

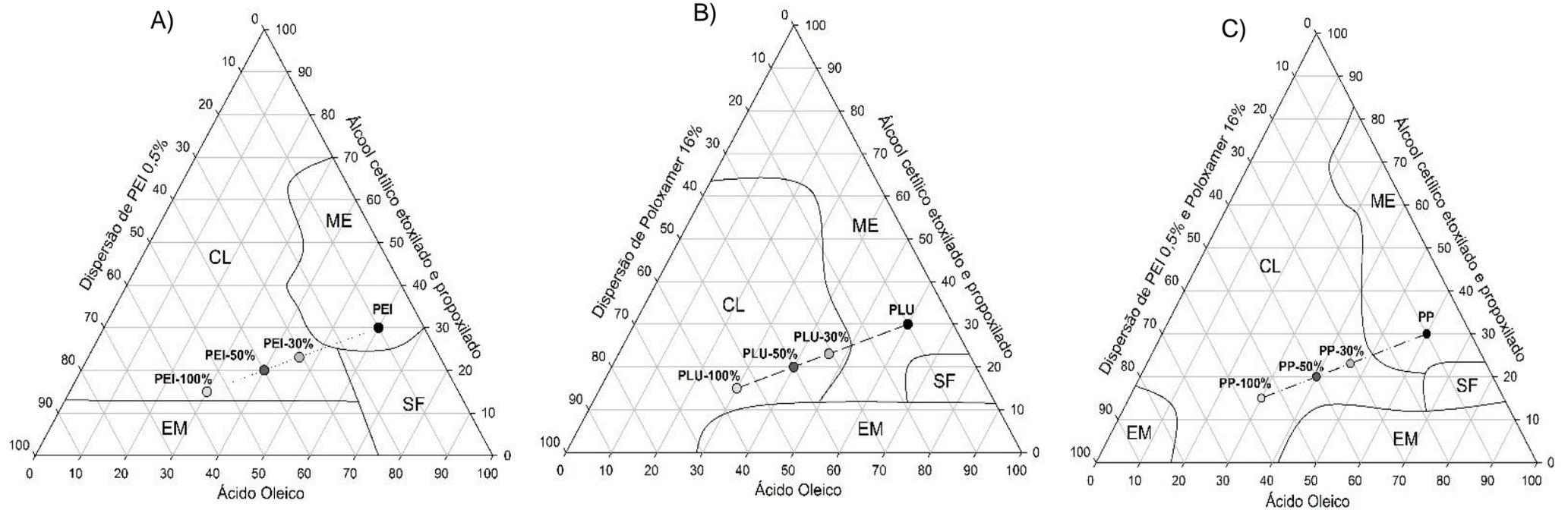
PEI-100%, além das estrias, constatou-se a presença de cruces-de-malta, indicativas de fase lamelar. É possível observar que, à medida em que se adicionou saliva artificial, os sistemas passaram de microemulsões para cristais líquidos, comportamento este também observado por Salmazi e colaboradores (2015) ao adicionar muco vaginal simulado em um sistema constituído por ácido oleico, álcool cetílico etoxilado e propoxilado e dispersão de quitosana e poloxamer.

As amostras PLU-0% e PP-0% apresentaram igualmente campo escuro, também corroborando com as avaliações sugeridas na análise visual. Nas amostras PLU-30%, PLU-50%, PP-30%, PP-50% e PP-100% foi possível observar a presença concomitante de estrias e cruces-de-malta, características de mesofases hexagonal e lamelar, respectivamente; na amostra PLU-100% observou-se apenas estrias, sendo classificada como cristal líquido hexagonal.

### **5.1.2. Diagrama de fases ternário após caracterização por MLP**

Após a caracterização por microscopia de luz polarizada, foi possível observar que as formulações anteriormente classificadas por análise visual como sistemas líquidos transparentes apresentaram campo escuro, indicativo de microemulsões. As regiões de sistema opaco também apresentaram campo escuro. Os sistemas translúcidos apresentaram na MLP a presença de cruz-de-malta e estrias, característico de sistemas líquido-cristalinos de mesofase lamelar e hexagonal, respectivamente. Para os sistemas transparentes viscosos observou-se a presença de campo escuro, o que sugere a formação de mesofase cúbica, a qual foi confirmada por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Dessa forma, a análise por microscopia de luz polarizada corroborou com a análise visual, realizada anteriormente. Os diagramas podem ser observados na Figura 10.

**Figura 10** - Diagramas de fases ternário A, B e C, classificados segundo microscopia de luz polarizada onde: cristal líquido (CL), emulsão (EM), microemulsão (ME) e separação de fases (SF).



Pode-se observar nos diagramas formados que a alteração dos polímeros na fase aquosa foi capaz de exercer modificações nas regiões de domínio do diagrama. Em diagramas contendo dispersão de PEI (A e C), as regiões de microemulsões foram mais estreitas (0-25% de fase aquosa). No diagrama B foi possível observar que apenas com a utilização de dispersão de poloxamer houve maior faixa de formação de sistemas microemulsionados (0-35% da dispersão). Conseqüentemente, a região de formação de cristais líquidos teve sua região estendida (0 a 85% de fase aquosa e de 10-100% de tensoativo). Em estudo realizado anteriormente por Bernegossi e colaboradores (2016) também foi observado o mesmo perfil da região de domínios de transição de microemulsões para sistemas líquido-cristalinos para um sistema em que se empregou como fase aquosa concentrações crescentes de dispersão de poloxamer (0,5, 0,75 e 1%). Fonseca-Santos (2015) obteve um aumento na região de domínio de sistemas líquido-cristalinos após empregar dispersão de poloxamer 0,5% associada de dispersão de quitosana 0,5% como fase aquosa. Pode-se observar, dessa forma, que as regiões de microemulsão são promissoras como precursoras de cristais líquidos, uma vez que a adição de fase aquosa pode promover a transição para regiões de formação de sistemas líquido-cristalinos.

Houve também uma diminuição da região de separação de fases quando utilizada a dispersão de poloxamer nos diagramas B e C (0-20% de fase aquosa, 10-25% de tensoativo e de 65-100% de fase oleosa) em relação ao diagrama A (0-25%, 0-30% e 55-100%).

Após tais observações comportamentais dos sistemas, foi escolhida uma formulação de cada diagrama, como pode ser observado nas Figuras 9A, 9B e 9C, considerando-se a baixa viscosidade das formulações, que viabiliza os ensaios microbiológicos *in vitro*, e promissora organização estrutural com a diluição aquosa. As formulações foram nomeadas como PEI, PLU e PP, todas com a mesma proporção de fase aquosa, oleosa e tensoativo, como pode ser observado na Tabela 4, assim como as diluições em saliva artificial, realizadas 3:1, 2:1, 1:1, que foram igualmente caracterizadas (Figura 11).

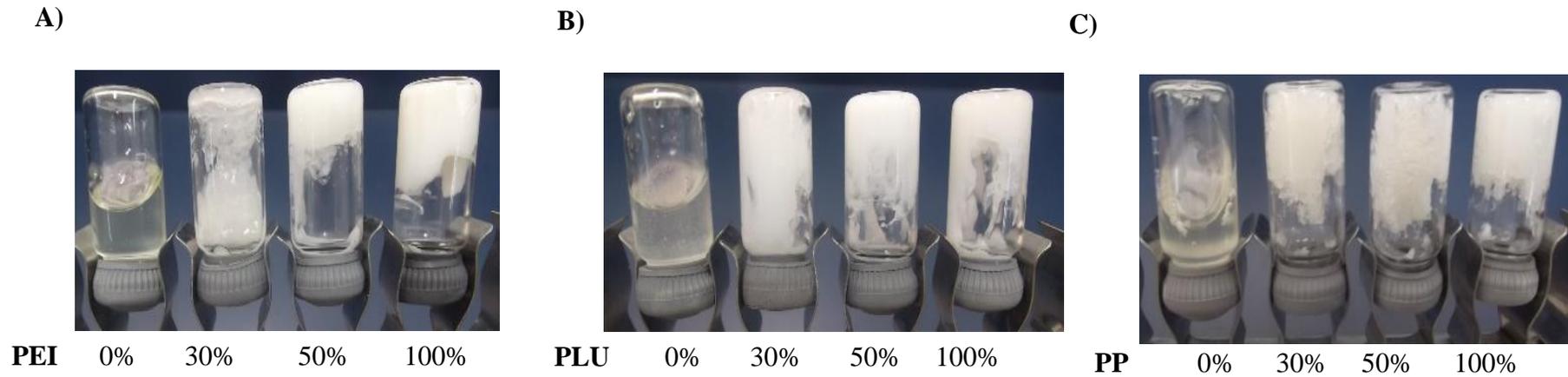
Esse método possibilitou a identificação do nível de organização estrutural das mesofases, observando se houve anisotropia, ou seja, se na presença de um

plano de luz polarizada a amostra foi capaz de desviar a luz incidente, ou se houve isotropia, ou seja, se não houve o desvio da luz polarizada.

**Tabela 4** - Composição das amostras precursoras de cristal líquido selecionadas e suas respectivas diluições com saliva artificial e adição de curcumina.

Formulações	Componentes % (m/m)						
	Álcool cetílico propoxilado e etoxilado	Ácido Oleico	Dispersão PEI 5%	Água purificada	Poloxamer	Saliva artificial	CUR (µM)
PEI	30	60	10	-	-	-	-
PEI-30%	30	60	10	-	-	30	-
PEI-50%	30	60	10	-	-	50	-
PEI-100%	30	60	10	-	-	100	-
PLU	30	60	-	10	16	-	-
PLU-30%	30	60	-	10	16	30	-
PLU-50%	30	60	-	10	16	50	-
PLU-100%	30	60	-	10	16	100	-
PP	30	60	10	-	16	-	-
PP-30%	30	60	10	-	16	30	-
PP-50%	30	60	10	-	16	50	-
PP-100%	30	60	10	-	16	100	-
PEI-CUR	30	60	10	-	-	-	80
PEI-CUR-30%	30	60	10	-	-	30	80
PEI-CUR-50%	30	60	10	-	-	50	80
PEI-CUR-100%	30	60	10	-	-	100	80
PLU-CUR	30	60	-	10	16	-	80
PLU-CUR-30%	30	60	-	10	16	30	80
PLU-CUR-50%	30	60	-	10	16	50	80
PLU-CUR-100%	30	60	-	10	16	100	80
PP-CUR	30	60	10	-	16	-	80
PP-CUR-30%	30	60	10	-	16	30	80
PP-CUR-50%	30	60	10	-	16	50	80
PP-CUR-100%	30	60	10	-	16	100	80

**Figura 11** - Imagens dos sistemas e suas respectivas diluições com saliva artificial sem curcumina; onde: A) PEI-0%, PEI-30%, PEI-50% e PEI-100%, B) PLU-0%, PLU-30%, PLU-50% e PLU-100% e C) PP-0%, PP-30%, PP-50% e PP-100%.



PEI: Formulação contendo Polietilenoimina 0,5%; PLU: Formulação contendo Pluronic® 16%; PP: Formulação contendo Polietilenoimina 0,5% e Pluronic® 16%.

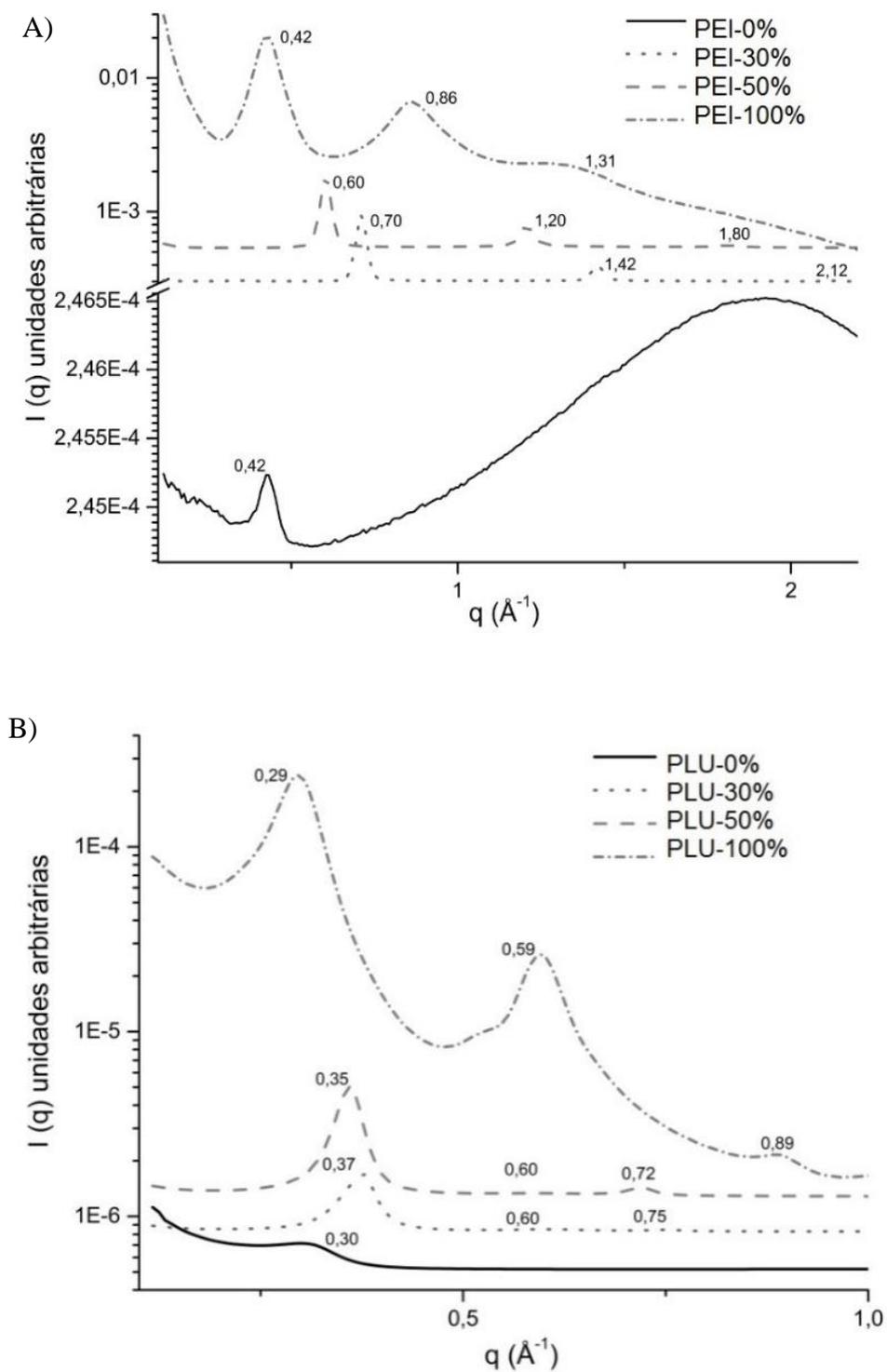
Destaca-se ainda na Figura 11, a diferenciação da coloração das formulações, onde é possível observar que em todas as formulações antes de serem diluídas com a saliva artificial (PEI-0%, PLU-0% e PP-0%), apresentavam-se translúcidas, característica de microemulsões e após a diluição houve uma transição para sistemas opacos, característicos de cristais líquidos. Isso porque a elevação da proporção de fase aquosa em contato com o tensoativo, pode ocasionar o empacotamento das micelas, derivando assim em estruturas nanoestruturadas, como as mesofases lamelar, hexagonal e cúbica (CARVALHO, 2012).

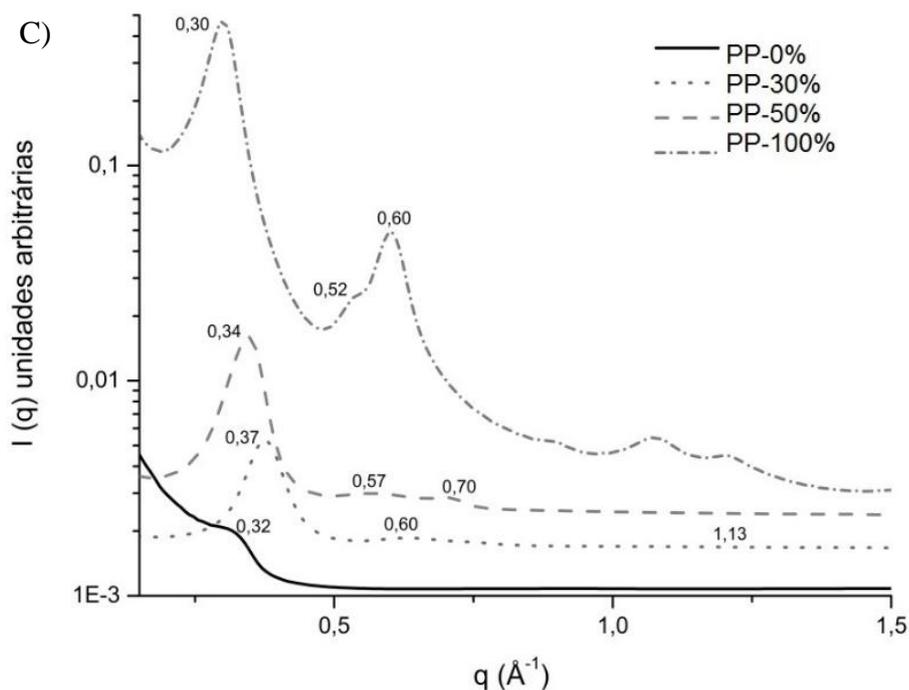
### **5.1.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)**

Apesar da microscopia de luz polarizada apresentar-se como uma ferramenta adequada para caracterização de sistemas líquido-cristalinos, se faz necessário a confirmação da organização estrutural com medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Essa é uma análise amplamente utilizada por diversos autores, pois é capaz de caracterizar microemulsões e cristais líquidos de maneira mais precisa, assim como gerar informações correspondentes às distâncias interplanares com dimensões nanométricas (OYAFUSO et al, 2014; MANAIA, 2012).

As curvas com os valores dos picos obtidos nesta análise das amostras PEI, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PLU, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% podem ser visualizadas na Figura 12.

**Figura 12** - Curvas de SAXS das formulações A) PEI, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, B) PLU, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100% e C) PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% (n= 3).





A relação dos picos de SAXS no vetor de espalhamento ( $q$ ) fornece dados relevantes, como as distâncias nanométricas quando usada a Equação 1:  $d = 2\pi/q_{\max}$ . O valor de  $q_{\max}$  é o valor de  $q$  no pico de refração. Também é possível sugerir a organização estrutural analisando a posição relativa dos picos, de modo que quando observa-se a relação de 1:2:3:4:5, tem-se mesofase lamelar, a relação  $\sqrt{1}:\sqrt{3}:\sqrt{4}$  é indicativa de fase hexagonal e  $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}$  de fase cúbica (OYAFUSO et al, 2014; SALMAZI et al, 2015).

Para melhor apreciação dos dados, os valores das distâncias calculadas foram expostos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Razão entre as distâncias interplanares ( $d_2/d_1$  e  $d_3/d_1$ ), distância do espaçamento (nm) entre duas camadas adjacentes para as mesofases lamelares e a distância entre as arestas dos cilindros para as mesofases hexagonais das amostras PEI, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PLU, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% e suas estruturas.

<b>Amostra</b>	<b><math>d_2/d_1</math></b>	<b><math>d_3/d_1</math></b>	<b>nm</b>	<b>Estrutura</b>
<b>PEI-0%</b>	-	-	-	Microemulsão
<b>PEI-30%</b>	2,02	3,02	0,89	Lamelar
<b>PEI-50%</b>	2,00	3,00	1,04	Lamelar
<b>PEI-100%</b>	2,04	3,11	1,49	Lamelar
<b>PLU-0%</b>	-	-	-	Microemulsão
<b>PLU-30%</b>	1,62	2,02	1,69	Hexagonal
<b>PLU-50%</b>	1,71	2,05	1,79	Hexagonal
<b>PLU-100%</b>	2,03	3,06	2,16	Lamelar
<b>PP-0%</b>	-	-	-	Microemulsão
<b>PP-30%</b>	1,62	3,05	1,69	Lamelar
<b>PP-50%</b>	1,67	2,05	1,84	Hexagonal
<b>PP-100%</b>	1,73	2,00	2,09	Hexagonal

Observou-se pela Tabela 5, juntamente com as Figuras 12A, 12B e 12C, que os resultados obtidos de SAXS para as formulações PEI-0%, PLU-0% e PP-0% corroboraram com as avaliações feitas na avaliação visual e em MLP (campo escuro), uma vez que apresentam um pico alargado, típico de microemulsões. As amostras PEI-30%, PEI-50% e PEI-100%, representadas na Figura 12A, apresentaram características de mesofase lamelar, pois apresentaram a relação dos picos de 2:3; todavia, na análise microscópica foram classificados como cristais líquidos de mesofase hexagonal, uma vez que apresentavam predomínio de estrias. Com isso, pode-se sugerir que esses sistemas estão em transição de mesofase lamelar para mesofases mais estruturadas, como as hexagonais.

Pela Figura 12B, observou-se a curva de SAXS da amostra PLU-0%. Verificou-se um único pico alargado, indicativo de microemulsões, confirmando a análise realizada em MLP, para a qual se havia observado campo escuro. As amostras PLU-30% e PLU-50% apresentaram a relação entre os picos

característicos de mesofase hexagonal, também corroborando com os resultados de MLP. Ainda na Figura 12B, pode-se observar para a amostra PLU-100% a presença de mesofase lamelar, não corroborando com as análises por microscopia de luz polarizada. Nesta amostra, pode-se observar que o sistema PLU transitou sua organização de microemulsão para cristal líquido de mesofase hexagonal com 30 e 50% de saliva artificial, e que após a adição de 100%, passou para uma fase menos estruturada dos cristais líquidos, que foi a lamelar. Sugere-se que houve uma excessiva diluição com a saliva artificial de modo a mudar da mesofase hexagonal para lamelar.

E por fim, na Figura 12C, pode-se sugerir pelas curvas de SAXS de PP-30% uma transição para mesofase lamelar, que de certa forma corrobora com as fotomicrografias desta mesma amostra, que apresentava tanto estrias como cruz-de-malta. As amostras PP-50% e PP-100% apresentaram relação entre os picos indicativa de mesofase hexagonal, confirmando o observado em MLP. Visando a aplicação na cavidade bucal, local que possui constante produção de saliva, esse comportamento pode ser interessante considerando a estruturação conforme a adição de saliva no sistema precursor de cristais líquidos, que pode levar à uma maior mucoadesão (CARVALHO et al., 2009).

Quanto à distância do espaçamento entre duas camadas adjacentes para as mesofases lamelares e a distância entre as arestas dos cilindros para as mesofases hexagonais, esta variou de 0,89 a 1,49 nm para as amostras de PEI, de 1,69 a 2,16 nm para as amostras de PLU e de 1,69 a 2,09 nm para as de PP. Observou-se, desta forma, que a adição da saliva artificial em todos os sistemas ocasionou aumento da distância interplanar entre as estruturas das mesofases.

Os resultados obtidos demonstraram que a análise de microscopia de luz polarizada oferece uma sugestão rápida e na maioria das vezes, mais acessível, da possível estruturação do sistema, a qual pode ser confirmada por uma técnica mais conclusiva, como o SAXS. Sendo assim, estas técnicas se complementam ao trazer informações quanto à caracterização estrutural do sistema (CHORILLI et al, 2009).

#### 5.1.4. Análise reológica contínua

As amostras dos sistemas precursores de cristais líquidos foram submetidas às medidas reológicas de fluxo contínuo afim de caracterizá-las quanto ao seu escoamento, propriedade importante para possibilitar a aplicação na cavidade bucal. Esta análise permite a observação da deformação de materiais quando se aplica uma tensão (SAVIC et al., 2011; CARVALHO, 2012). O resultado é representado graficamente em curvas de fluxo, correlacionando a taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento, tendo uma curva ascendente, a qual sinaliza o aumento da taxa de cisalhamento e a curva descendente, que por sua vez, representa a diminuição da taxa (PESTANA, 2009; SCHRAMM, 2006).

Observando a curva ascendente é possível classificar a amostra analisada como Newtoniana e não Newtoniana. Caso a amostra apresente-se como não Newtoniana, realiza-se uma segunda etapa de classificação, podendo ser não Newtoniana pseudoplástica, plástica ou dilatante. As amostras classificadas como pseudoplásticas apresentam a diminuição de sua viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. Nas amostras plásticas, é necessário que haja uma força maior aplicada para superar a força de reticulação e iniciar o escoamento, e finalmente, para as dilatantes ocorre aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento (LAHOUD e CAMPOS, 2010).

A curva descendente pode ser classificada como reopética (ou tixotrópica negativa), quando a tensão de cisalhamento é diminuída e ainda assim, a viscosidade aparente é aumentada, ou tixotrópica, quando sua viscosidade é diminuída com a diminuição da tensão (CALIXTO, 2013).

O material com curva ascendente Newtoniana apresenta viscosidade constante, uma vez que a velocidade de cisalhamento é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento exposta.

Os reogramas de fluxo obtidos estão representados na Figura 13.

**Figura 13** - Reogramas das amostras: A) PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, B) PEI-CUR-0%, PEI-CUR-30%, PEI-CUR-50%, PEI-CUR-100%, C) PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100% D) PLU-CUR, PLU-CUR-30%, PLU-CUR-50%, PLU-CUR-100%, E) PP, PP-30%, PP-50% e PP-100% e F) PP-CUR-0%, PP-CUR-30%, PP-CUR-50% e PP-CUR-100%. Os símbolos fechados representam as curvas ascendentes e os abertos, as curvas descendentes.

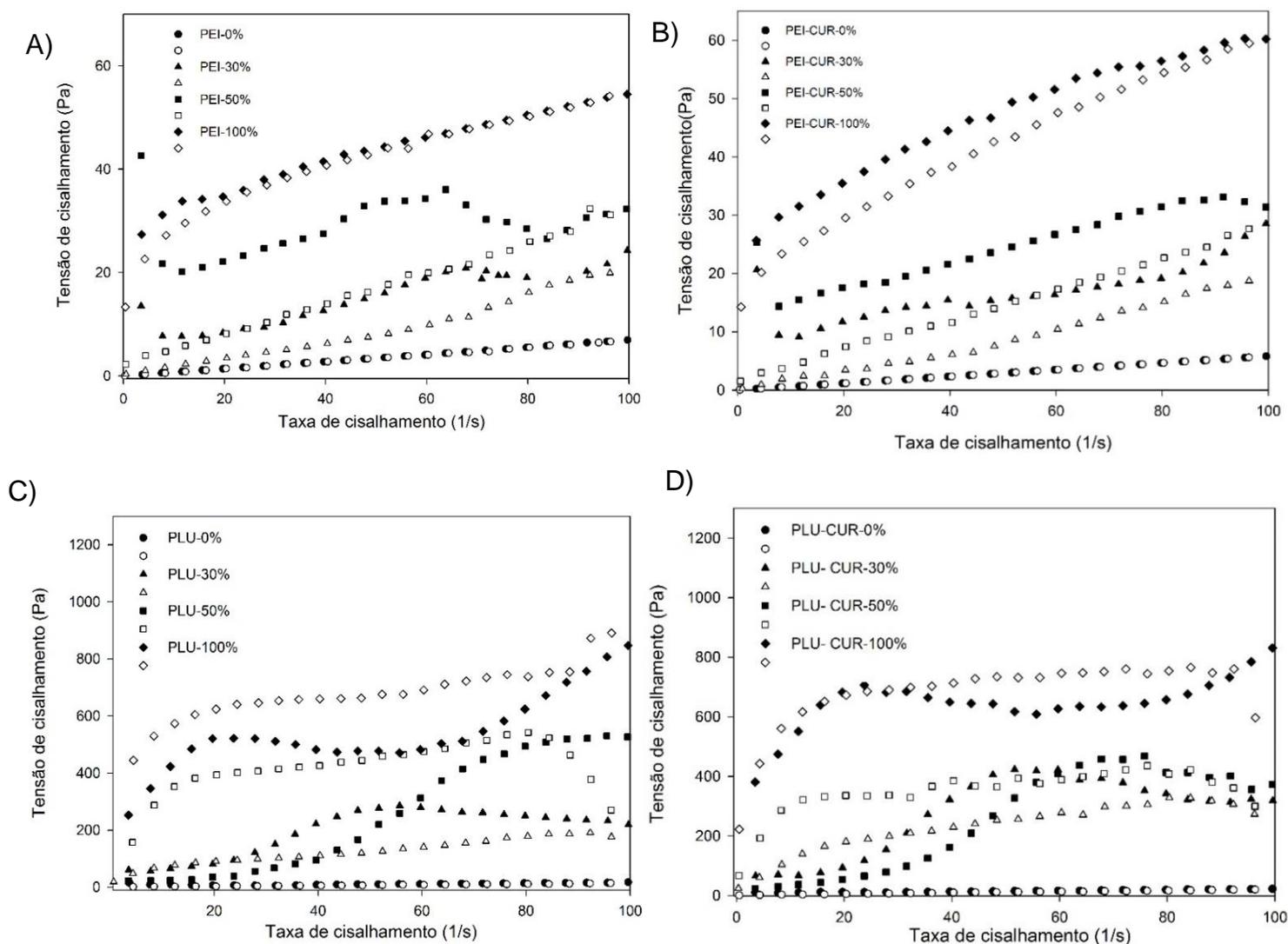
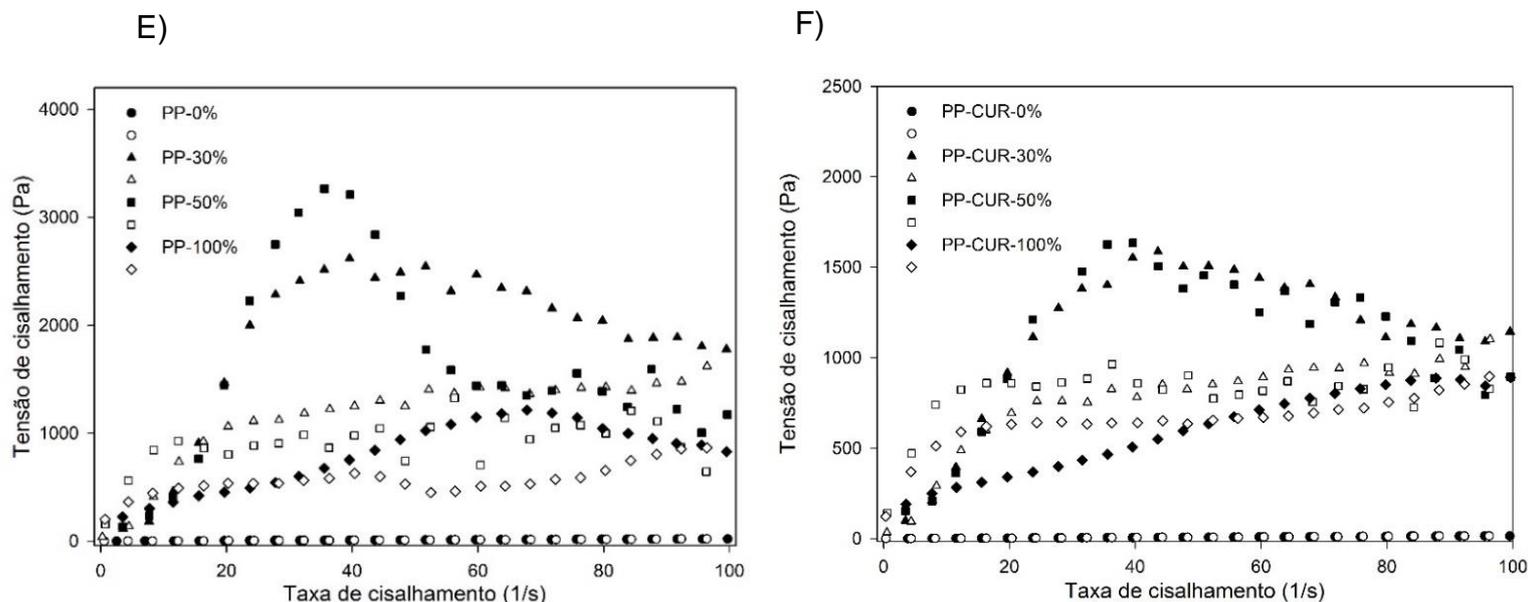


Figura 13 - continuação



Pode-se observar que nos reogramas das Figuras 13A e 13B, as amostras de PEI-0% com e sem a incorporação de curcumina apresentaram comportamento Newtoniano. Sistemas com comportamento Newtoniano apresentam valores de tensão e taxa de cisalhamento constantes partindo da origem zero, mostrando uma linha linear, indicando que a viscosidade do fluido não varia com as alterações na taxa de cisalhamento (ISAAC et al., 2008). Já as amostras PEI-30%, PEI-CUR-30%, PEI-50% e PEI-CUR-50% mostraram comportamento não Newtoniano pseudoplástico, uma vez que necessitaram de uma tensão mínima necessária para iniciar o seu escoamento. Suas curvas descendentes demonstraram comportamento tempo dependente para voltar ao estado inicial da amostra, com área de histerese, sendo assim caracterizadas como tixotrópicas. As formulações PEI-100% e PEI-CUR-100% apresentaram comportamento semelhante ao das formulações PEI-30%, PEI-CUR-30%, PEI-50% e PEI-CUR-50%, porém houve uma diminuição da área de histerese, mostrando que o tempo necessário para que a formulação volte ao seu estado inicial é menor.

Nas Figuras 13C e 13D, é possível visualizar que as amostras PLU-0% e PLU-CUR-0% apresentaram comportamento Newtoniano, da mesma maneira que as de PEI não acrescidas de saliva artificial; quando adiciona-se 30% de saliva.

Ambas as amostras passam a se comportarem como pseudoplásticas, com formação de área de histerese, mostrando-se tixotrópicas logo após a diminuição da tensão e com uma suave tixotropia negativa antes de voltar ao seu estado inicial. Estes dados demonstram que após a formulação sofrer uma força aplicada, em seu retorno há um leve aumento de sua viscosidade. Os mesmos comportamentos são observados nas amostras PLU-100% e PLU-CUR-100%, com um aumento de aproximadamente 10 Pa na tensão de cisalhamento e nas curvas descendentes, apresentando reopexia ao retornar para seu estado inicial.

As amostras PLU-50% e PLU-CUR-50% apresentaram comportamento pseudoplástico, não havendo a necessidade de atingir maiores valores de tensão de cisalhamento. O mesmo foi observado para as amostras PLU-30% e PLU-CUR-30% em suas curvas descendentes.

Nas Figuras 13E e 13F, as amostras PP-0% e PP-CUR-0%, assim como as demais em que ainda não havia se adicionado saliva artificial, mostraram-se Newtonianas, com uma visível estruturação após a diluição de 3:1, 2:1 e 1:1 de saliva. Essa estruturação foi detectada uma vez que esses sistemas tiveram seu comportamento alterado de Newtoniano para não Newtoniano com comportamento pseudoplástico tanto nas formulações com curcumina, como nas formulações sem a incorporação de curcumina. Contudo, após a introdução da curcumina, essas amostras atingiram menores valores de tensão de cisalhamento. Com isso, sugere-se que a curcumina originou uma mínima desestruturação da conformação do sistema desenvolvido, ocasionando a redução da viscosidade. Esse comportamento pode favorecer a administração da formulação, uma vez que durante a força de extrusão da formulação a viscosidade é reduzida e após cessar a força, a formulação irá retornar ao seu estado inicial (JONES, WOOLFSON, BROWN, 1997).

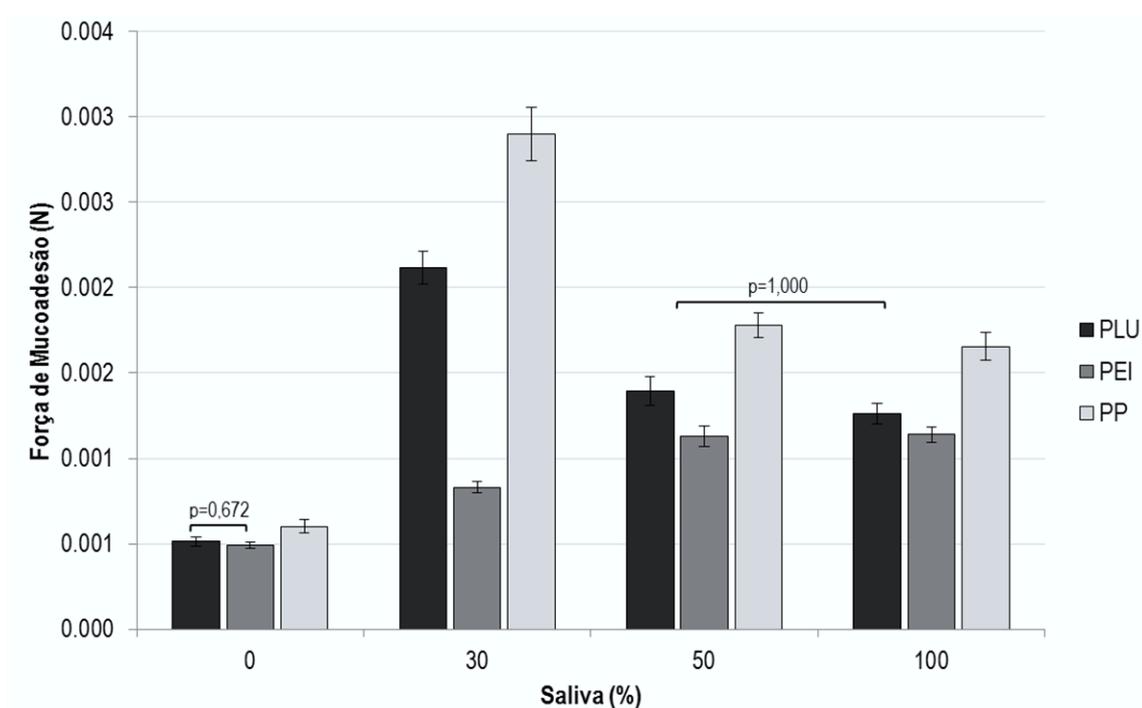
No geral, com exceção das amostras de PP, as formulações não sofreram alterações em seu comportamento quanto ao perfil das curvas ascendentes e descendentes. Todas as formulações primárias selecionadas corroboram que foi possível a obtenção de sistemas precursores de cristais líquidos, pois de sistemas Newtonianos, característico de microemulsões, passaram a se comportar como pseudoplásticos, típico de sistemas mais estruturados (SALMAZI et al, 2015; BERNEGOSSI et al., 2016).

### 5.1.5. Força de mucoadesão *in vitro*

O teste para detecção da força mucoadesiva de sistemas de liberação de fármacos é uma ferramenta importante quando se trata da busca por tais sistemas visando aplicações pelas vias bucal, nasal e vaginal (YU, ANDREWS & JONES, 2014).

Os resultados obtidos da força mucoadesiva das formulações desenvolvidas estão representadas na Figura 14.

**Figura 14** - Força de mucoadesão (N) *in vitro* dos SPCL PLU-0%, PLU-30%, PLU-50%, PLU-100%, PEI-0%, PEI-30%, PEI-50%, PEI-100%, PP-0%, PP-30%, PP-50%, PP-100% (n= 10).



A interação entre dois elementos, em que pelo menos um deles é de procedência biológica e que persistem unidos por um determinado tempo, é chamada de mucoadesão (VARUM et al, 2008).

A capacidade dos sistemas avaliados em permanecer na cavidade bucal foi detectada pela constatação da força necessária para romper a interação entre as mucosas esofágicas suínas *ex vivo* e os SPCL desenvolvidos.

Como pode-se observar na Figura 14, as amostras de PLU, PEI e PP, sem a adição de saliva artificial, apresentaram as menores forças (0,5 N) de mucoadesão quando comparados aos sistemas com 30, 50 e 100% de saliva artificial. Além disso, os sistemas que continham apenas a dispersão de poloxamer apresentaram maiores forças mucoadesivas quando comparado às amostras que eram compostas apenas pela dispersão de polietilenoimina. Tal propriedade do poloxamer também foi constatada por Jones e colaboradores (2009) que estudaram hidrogéis mucoadesivos contendo o poloxamer 407 e Carbopol® 974P e realizaram teste de mucoadesão de várias amostras, variando a concentração do poloxamer e mantendo as concentrações do Carbopol® fixas. Os autores observaram que o poloxamer influenciou consideravelmente a mucoadesão nos hidrogéis quando em contato com discos de mucina.

As formulações acrescidas de saliva foram significativamente mais mucoadesivas, mostrando um aumento da força necessária para o rompimento da força interfacial, visto que se estruturaram para cristais líquidos. Este resultado indica que a mudança de microemulsões para uma mesofase com estrutura mais rígida, como lamelar e hexagonal, proporcionam um aumento na força mucoadesiva, corroborando com os resultados obtidos por Carvalho e colaboradores (2010).

Avaliando a alteração das composições das fases aquosas, também foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa quando se compara as amostras entre a mesma diluição, sendo que em todos os casos, as formulações contendo a associação de poloxamer e polietilenoimina apresentaram maior força mucoadesiva. Porém quando avaliadas as formulações contendo apenas a dispersão de poloxamer (PLU) e as formulações contendo a dispersão de polietilenoimina (PEI), percebe-se que as que continham poloxamer mostraram-se mais mucoadesivas (PP e PLU), sobretudo com a adição de 30% de saliva artificial. Esses dados sugerem que a interação entre os polímeros foi importante para que houvesse maior interação da mucosa esofágica suína com a formulação. Resultados semelhantes foram obtidos por Cafaggi e colaboradores (2004) que analisaram a força mucoadesiva de preparações com a associação de poloxamer e quitosana em mucosa bucal suína e observaram aumento da força mucoadesiva com a associação dos polímeros.

A administração de fármacos na cavidade bucal é prejudicada por vários fatores que diminuem extremamente o tempo de residência da forma farmacêutica no local de ação. A mastigação, deglutição, fala e a frequente produção de saliva favorecem a redução do tempo de permanência nessa região. Com isso, os sistemas SPCL mostram-se como potenciais carreadores, uma vez que podem captar a saliva do ambiente bucal e transitarem para sistemas mais mucoadesivos, como notado no teste.

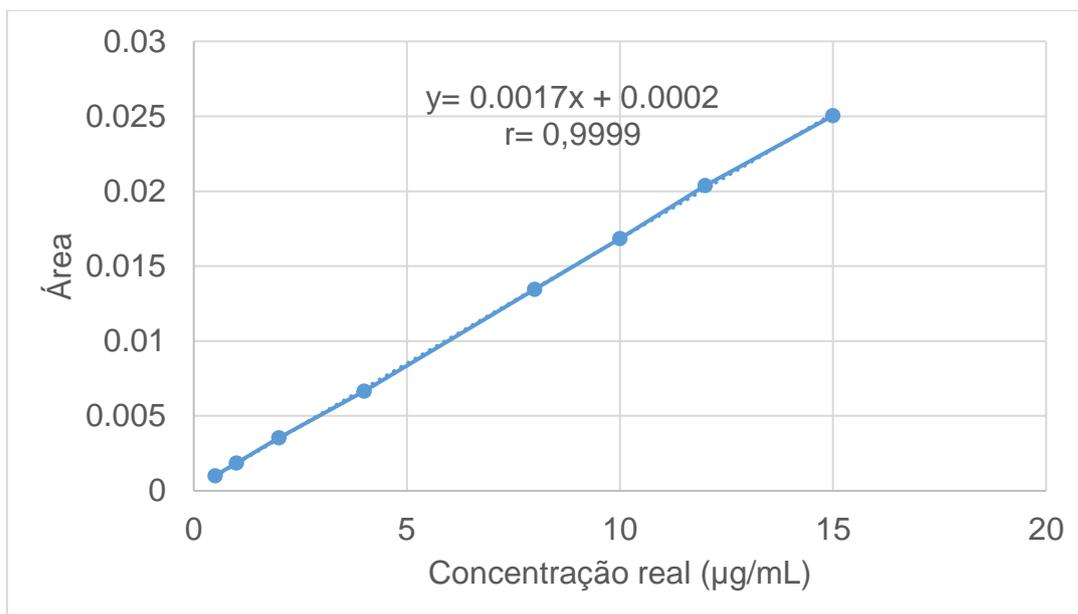
Segundo Carvalho e colaboradores (2014), a efetividade terapêutica pode ser melhorada com o aumento do tempo de contato do medicamento no local de ação, conciliada com aplicação da tecnologia na liberação do fármaco, modificando sua entrega, permite diminuir a dose e frequência da administração.

## **5.2. Método analítico para quantificação da curcumina**

Foi construída uma curva analítica de modo a permitir a quantificação da curcumina liberada das formulações estudadas, tanto no teste de liberação quanto no teste de permeação *in vitro*. A curva foi elaborada segundo metodologia descrita no item 3.2.1.

O gráfico da curva analítica juntamente com a equação da reta e seu coeficiente de correlação estão apresentados na Figura 15.

**Figura 15** - Curva analítica da curcumina, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (r) obtidos por meio do método de CLAE (n= 3).



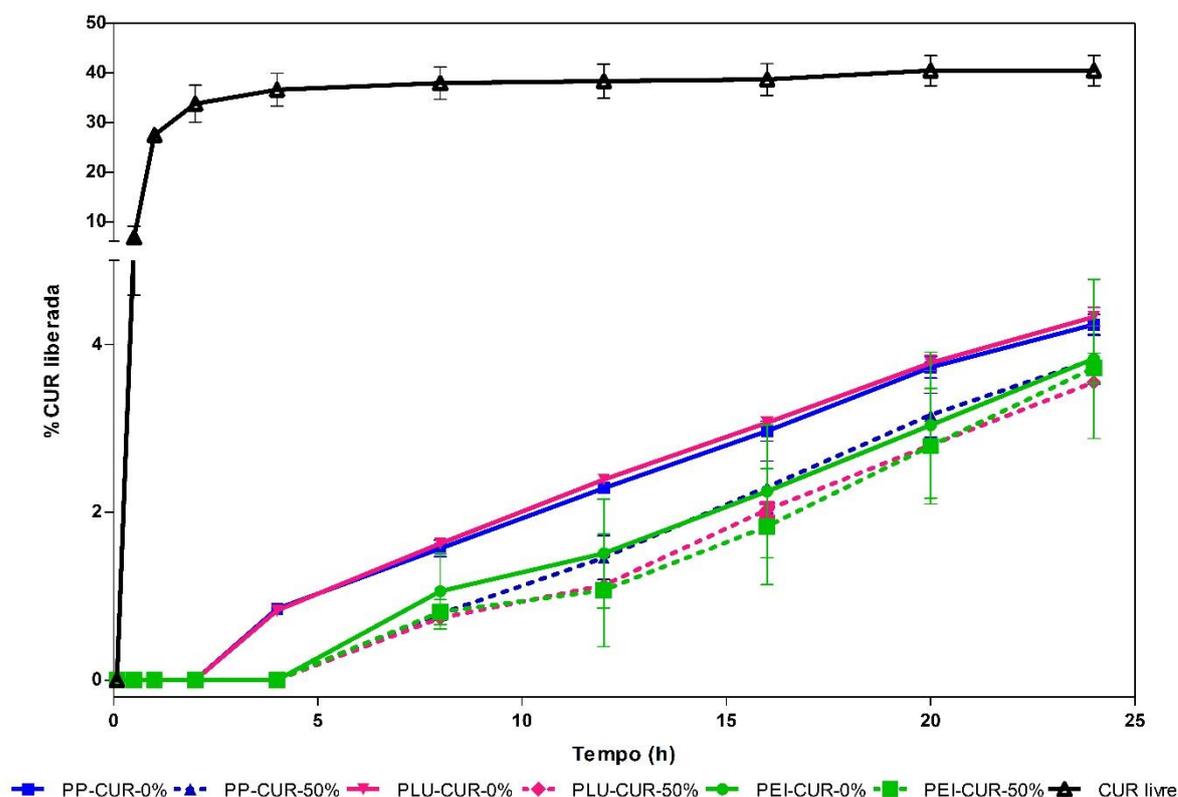
Foi possível observar que a curva apresentou-se linear e com valor de r (0,9999) dentro do determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária que é de no mínimo 0,990 (BRASIL, 2017).

### 5.3. Teste de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* proporcionam informações importantes sobre as características de carreadores de fármacos para o entendimento da cinética de liberação. Tais características favorecem a correlação com os componentes da formulação.

Foi possível observar a liberação de curcumina dos sistemas nanoestruturados, os quais são demonstrados em percentual na Figura 16. Para comparação dos resultados, foi realizada também a análise do perfil de liberação de curcumina apenas em solução receptora, a qual é demonstrada na cor preta, denominada como curcumina livre.

**Figura 16** - Perfil de liberação de curcumina em sistemas precursores de cristais líquidos após 24 horas de análises, das amostras PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50% e em solução receptora, CUR livre (n= 3).



Como observado na Figura 16, ambas as formulações analisadas, PP-CUR-0% e PLU-CUR-0%, apresentaram início de liberação da curcumina, a partir do tempo quatro horas de ensaio. Para as formulações PP-CUR-50%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0% e para a PEI-CUR-50% até o tempo 8 horas de ensaio, com conseqüente liberação exponencial. Já quando observada a curcumina em solução, pode-se constatar que a partir da segunda coleta, ou seja, 30 min houve uma liberação de 10%, finalizando o experimento após 24h de análise com um total de 40% da massa de curcumina disponível na solução receptora coletada. Como pode ser observado na Tabela 6, onde mostra a porcentagem total de curcumina liberada das formulações estudadas, liberaram no máximo 4,33% da massa de curcumina que havia sido incorporada, as quais foram estatisticamente diferentes da liberação da curcumina considerada livre (40,47%).

Fujimura (2014) observou uma baixa taxa (máximo 5%) de liberação de *trans-resveratrol* incorporado em cristais líquidos. Estudos conduzidos por Fonseca-Santos e colaboradores (2016) obtiveram os mesmos resultados no ensaio de liberação de curcumina a partir de sistemas líquido-cristalinos empregando membrana sintética de acetato de celulose, sugerindo que as baixas concentrações recuperadas após o ensaio de liberação podem ser justificadas devido à forte ligação dos fármacos - uma vez que esses são altamente lipofílicos - com os componentes da fase oleosa e tensoativo dos sistemas líquido-cristalinos, logo, prolongando a retenção na forma farmacêutica.

**Tabela 6** - Percentual de curcumina total liberada dos sistemas precursores de cristais líquidos PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%, após 24 horas de análise.

Formulação	Liberação de CUR (%)
	24horas
<b>CUR-livre</b>	40,47 ± 3,04 <sup>a</sup>
<b>PP-CUR-0%</b>	2,93 ± 0,12 <sup>b</sup>
<b>PP-CUR-50%</b>	3,82 ± 0,29 <sup>b</sup>
<b>PLU-CUR-0%</b>	4,33 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>PLU-CUR-50%</b>	3,55 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>PEI-CUR-0%</b>	3,83 ± 0,95 <sup>b</sup>
<b>PEI-CUR-50%</b>	3,72 ± 0,18 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Ressalta-se que apesar do perfil de liberação apresentar-se modificado entre as amostras com e sem saliva artificial, a porcentagem total final liberada entre todas as formulações, não apresentou diferença significativa.

Há na literatura modelos matemáticos que ajustam a curva de liberação experimental, podendo ser constatado pelo valor de  $r^2$ , para que haja um melhor entendimento quanto ao mecanismo de liberação relacionado.

Pela mudança estrutural consequente da diluição causada pelo tensoativo presente nos sistemas, torna-se dificultoso o modelamento matemático da liberação de fármacos compostos por este. Embora exista essa falta de

referências encontradas, foram aplicadas equações já apresentadas na literatura que avaliaram formas farmacêuticas que continham polímeros. Foram aplicados os modelos mais utilizados e que melhor descrevem os fenômenos de liberação, como Higuchi (SIEPMANN e PEPPAS, 2011) e Weibull (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Os modelos matemáticos são relacionados por meio de interpretações teóricas do progresso da dissolução e liberação do fármaco em função do tempo estudado e relevando a forma farmacêutica em questão (CARVALHO, 2012; COSTA e SOUSA LOBO, 2001).

Na Tabela 7 é possível observar os valores de  $r^2$  obtidos após a aplicação dos modelos matemáticos Weibull, de Primeira Ordem e Higuchi.

**Tabela 7** - Coeficiente de liberação *in vitro* da curcumina (24h) obtida, pelos de diferentes modelos matemáticos para as formulações PP-CUR-0%, PP-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%.

Modelos matemáticos	Valor r quadrado ( $r^2$ )					
	PP-CUR-0%	PP-CUR-50%	PLU-CUR-0%	PLU-CUR-50%	PEI-CUR-0%	PEI-CUR-50%
<b>Weibull</b>	<b>0,9717</b>	<b>0,9993</b>	<b>0,9994</b>	<b>0,9972</b>	<b>0,9964</b>	<b>0,9942</b>
<b>Primeira Ordem</b>	0,9151	0,9549	0,9902	0,9443	0,9638	0,9304
<b>Higuchi</b>	0,8609	0,7501	0,8699	0,7329	0,7701	0,7153

Conforme observado na Tabela 7, o modelo matemático Weibull, também conhecido como modelo de Rosin-Rammler-Sperling-Weibull (RRSW), foi o mais ajustável as curvas de liberação da curcumina em sistemas precursores de cristais líquidos e também nos sistemas que continham saliva artificial em sua composição, que como já citado anteriormente neste trabalho, transitaram para sistemas de cristais líquidos.

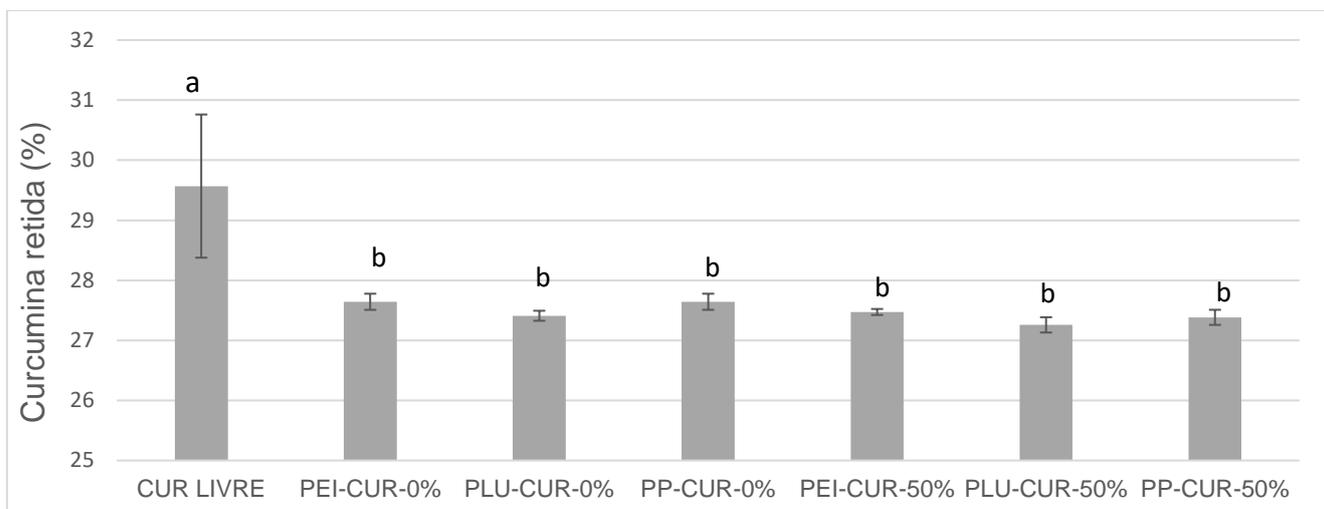
Esse modelo pode ser aplicado com êxito a quase todos os tipos de curvas (Costa, 2002). Ele indica um mecanismo complexo de liberação, envolvendo concomitantemente, a relaxação das cadeias poliméricas e a erosão do polímero no momento da liberação (RIGON, 2013).

#### **5.4. Permeação e retenção em mucosa de esôfagos suínos**

Este experimento é de grande importância para a avaliação de produtos farmacêuticos tópicos em desenvolvimento, uma vez que responde a capacidade de permeação do fármaco em membranas biológicas que mimetizam as humanas da via de interesse, mucosa bucal.

Neste teste não foi constatada a permeação da curcumina a partir das formulações PEI, PEI-50%, PLU, PLU-50%, PP e PP-50% após 24 horas de análise. Porém, foi observado que houve retenção da curcumina na membrana biológica após 24 horas do teste *ex vivo*, Figura 17, de aproximadamente 27,5% para todas as amostras de SPCL. A análise estatística mostrou que houve diferença entre as médias de porcentagem entre a retenção da curcumina livre e as formulações.

**Figura 17** - Porcentagem de curcumina retida em mucosas suínas utilizadas durante o ensaio de liberação *ex vivo* (n= 6).



Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No teste de retenção *ex vivo*, pode-se observar que houve maior retenção da curcumina testada em solução (curcumina livre) nas mucosas, quando comparado com formulações. As variações da composição das formulações, ou seja, com e sem a adição de saliva artificial, e conseqüentemente a transição de SPCL para cristais líquidos, não foram capazes de interferirem significativamente entre as amostras estudadas neste teste.

O fato da curcumina ter ficado retida na membrana pode ter sido motivado pela alta afinidade com a mucosa (BARRY et al., 2009). Tal comportamento é tido como vantajoso no caso da proposta do tratamento tópico da candidose bucal, com e sem a associação da terapia fotodinâmica, pois permite a ação *in situ* da forma farmacêutica.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Fonseca-Santos e colaboradores (2016), que estudaram sistemas compostos por ácido oleico, álcool cetílico etoxilado e propoxilado e dispersões de quitosana associados ou não a poloxamer. Os autores observaram que após 12h de ensaio de permeação a curcumina não foi capaz de permear a mucosa esofágica, ficando assim retida no tecido *ex vivo*.

### 5.5. Fotodegradação da curcumina

Os espectros de absorção óptica e emissão de fluorescência obtidos no estudo da fotodegradação da curcumina estão representados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

**Figura 18** - Espectros de absorbância ótica de DMSO, PEI, PLU e PP, com e sem curcumina 80  $\mu\text{M}$ , degradado com LED em 450 nm em 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 e 30 minutos. Intensidade de 33,58  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . Dose de irradiação variando de 0-60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Onde, A) DMSO, B) Solução de curcumina em DMSO, C) PEI, D) PEI-CUR E) PLU, F) PLU-CUR, G) PP e H) PP-CUR (n= 3).

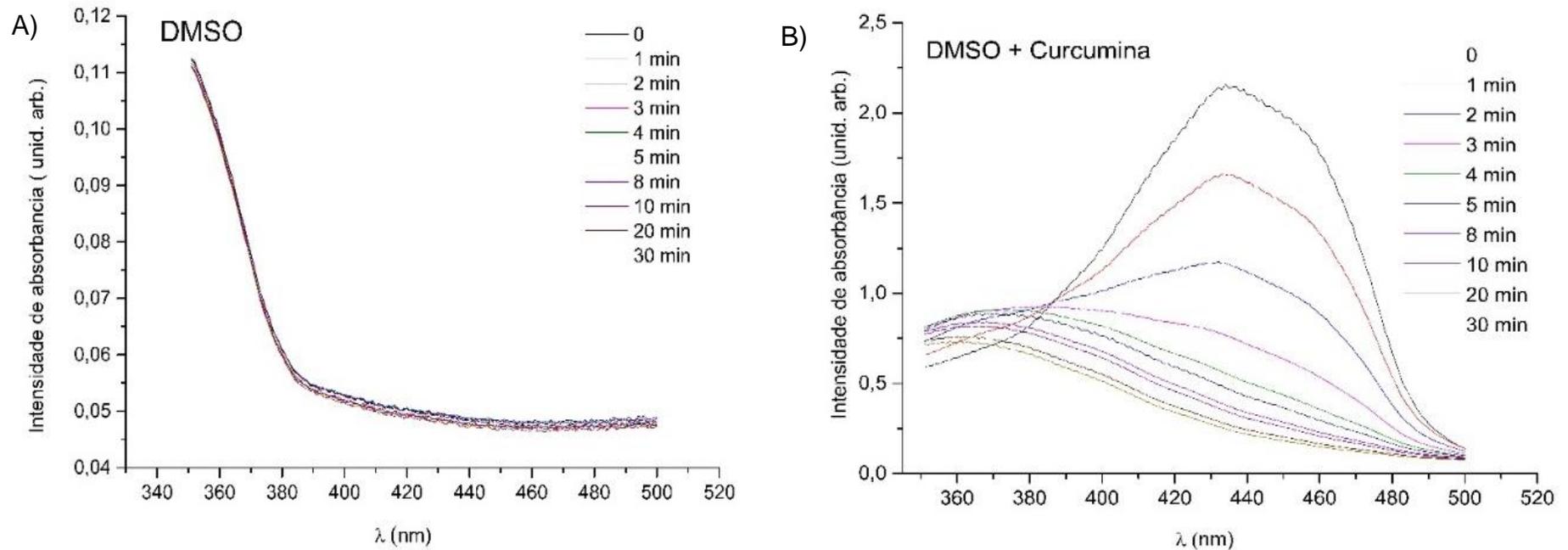


Figura 18 - continuação

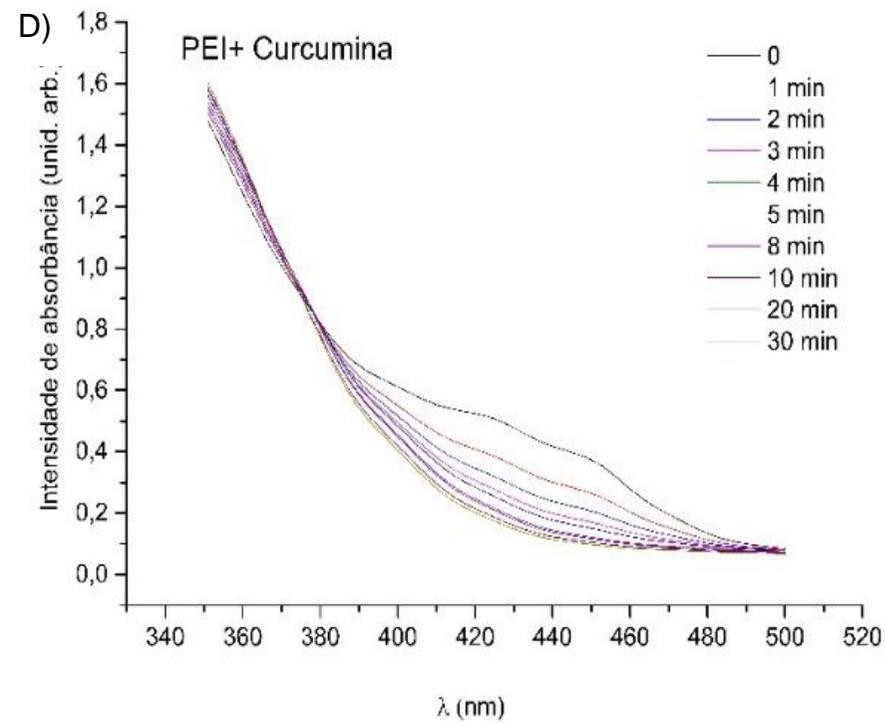
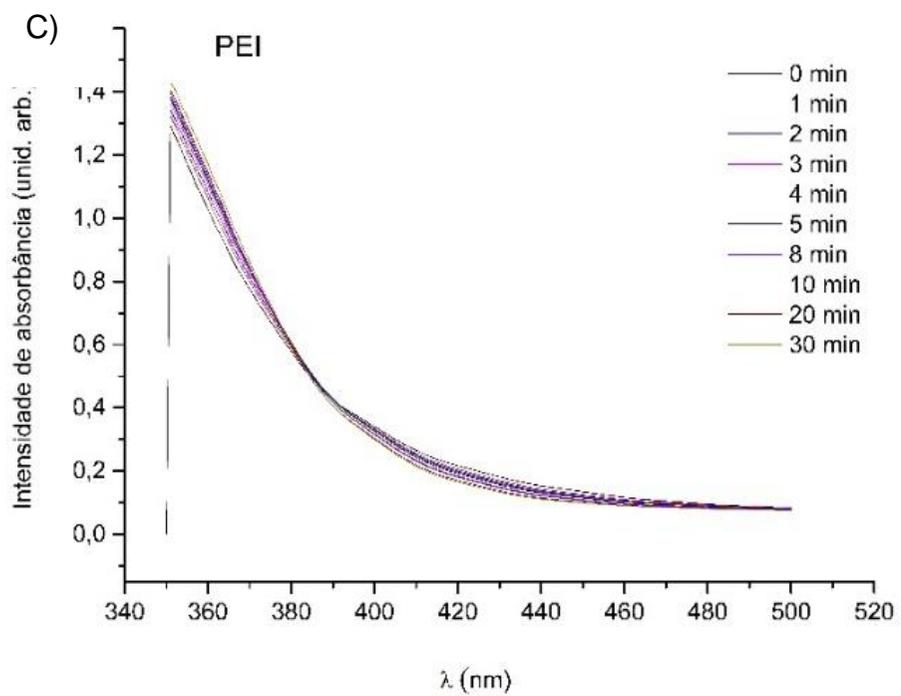


Figura 18 - continuação

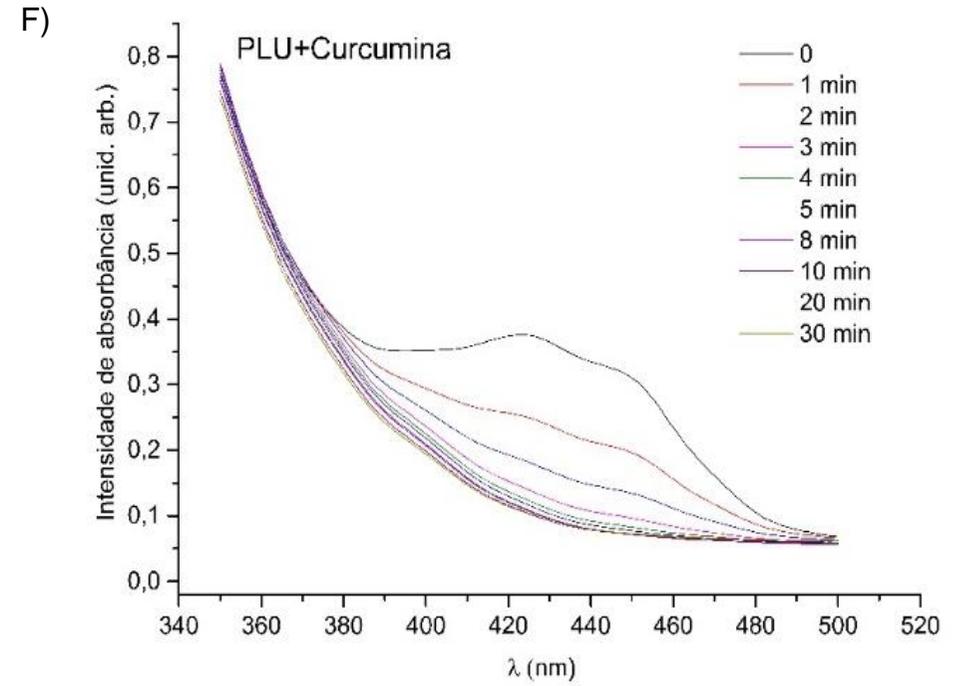
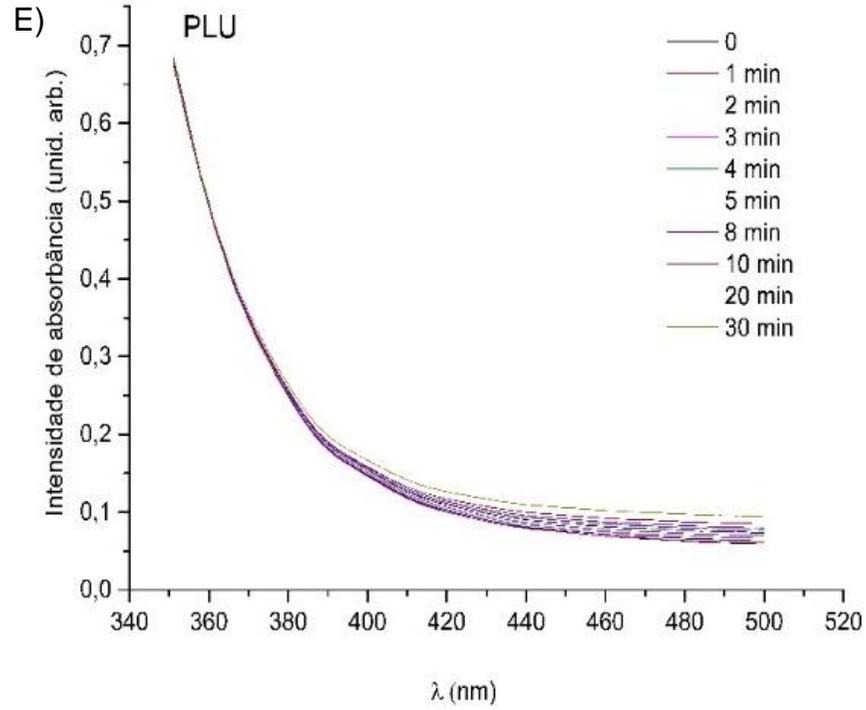
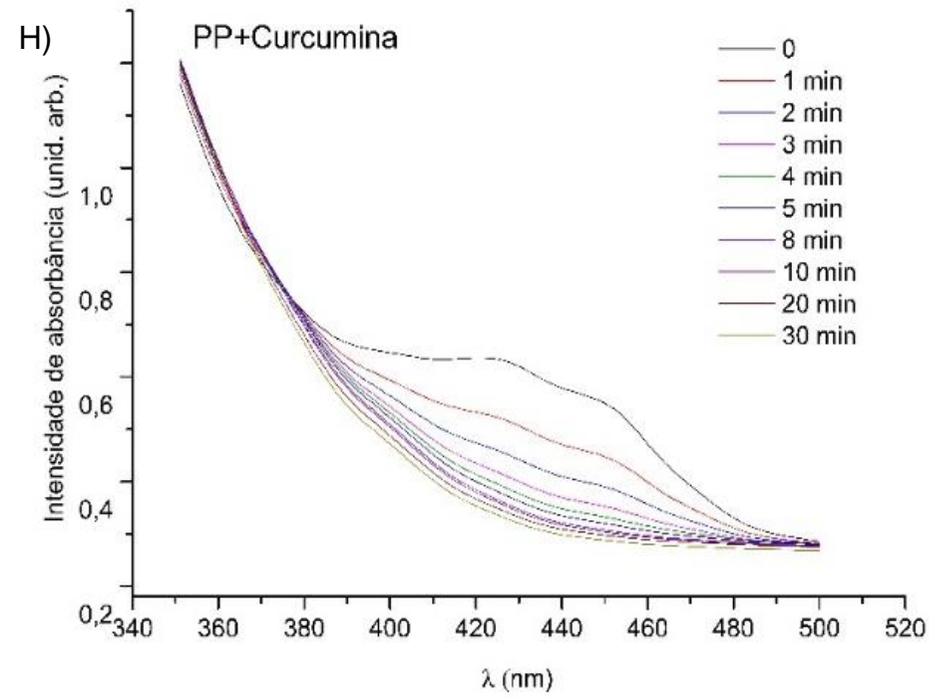
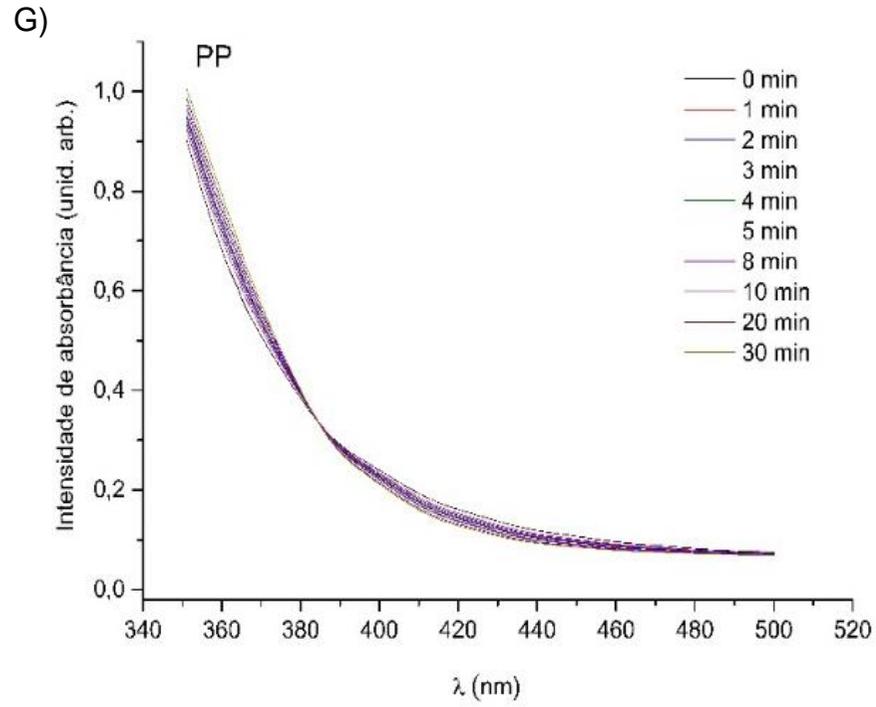
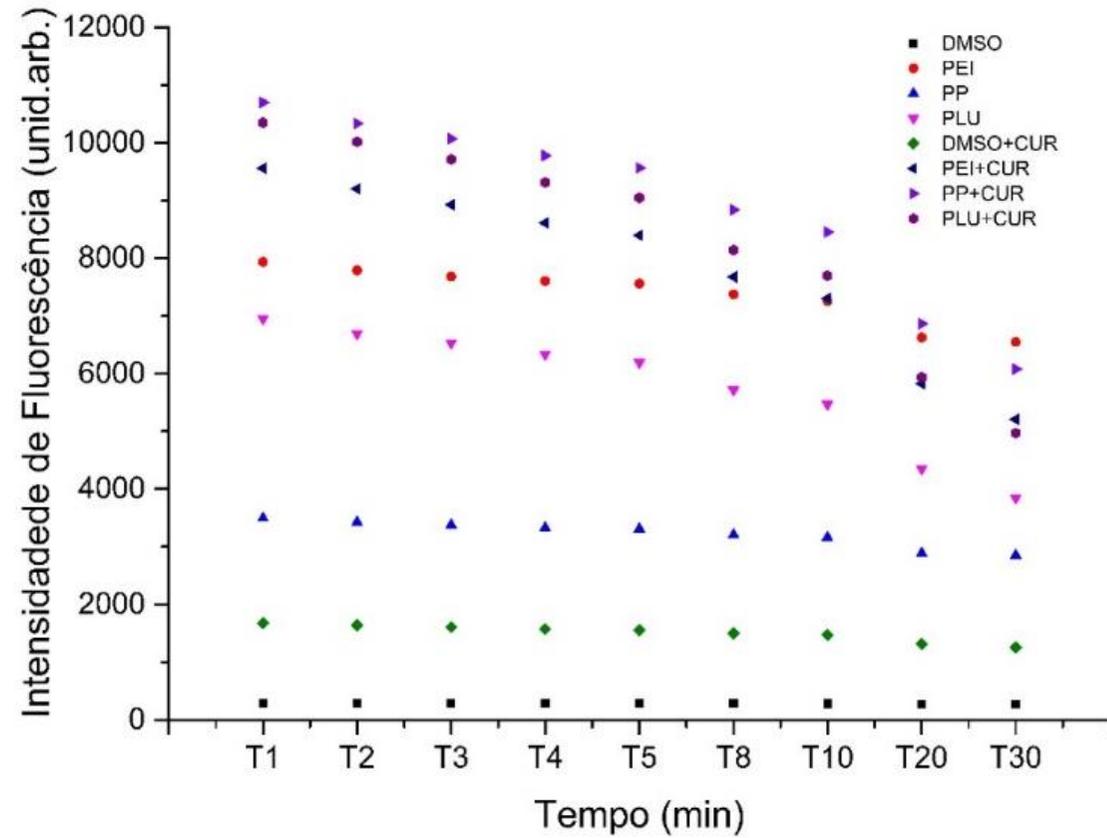


Figura 18 - continuação



**Figura 19** - Espectros de intensidade de fluorescência de DMSO, PEI, PLU e PP, com e sem da Curcumina 80  $\mu\text{M}$ , degradado com LED em 450 nm em 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 e 30 minutos. Intensidade de 33,58  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . Dose de irradiação variando de 0-60  $\text{J}/\text{cm}^2$ .



Pode-se observar claramente na Figura 18B que a curcumina em solução de DMSO apresenta maior intensidade de absorbância (3,5 u.a.) que a curcumina incorporada nas formulações PP, PLU e PEI. Esse acontecimento pode ser devido a maior disponibilidade que a curcumina apresenta em solução que quando comparado às amostras incorporadas nas formulações, uma vez que esses sistemas podem apresentar proteção ao fármaco.

Observa-se também, nas Figuras 18C, 18E e 18G que as formulações sem a incorporação da curcumina, apresentaram uma discreta absorção em comparação com o DMSO, intensidades de aproximadamente 0,18-0,28, e 0,06 para o último solvente citado. Esses dados corroboram com o que podemos observar na Figura 19, dos espectros de fluorescência, que apontam a capacidade de fluorescência das amostras de SPCL, enquanto que o DMSO permanece com intensidade de fluorescência nula, uma vez não foi capaz de absorver luz. Apesar da CUR+DMSO ser capaz de melhor absorver luz, não teve sua intensidade de fluorescência elevada. A amostra PP-CUR foi a que revelou maior intensidade de fluorescência após ser irradiada.

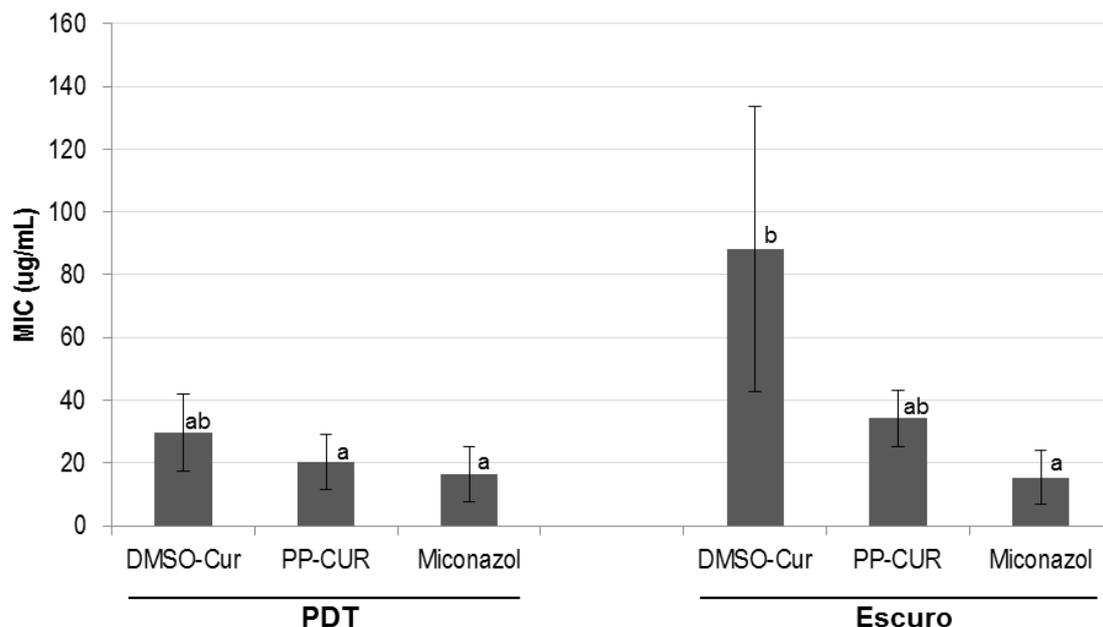
Com base nos resultados obtidos, foi estipulado que a irradiação com LED até o T10, que equivale a uma dose de luz de 10,07 J/cm<sup>2</sup>, para aplicação da terapia fotodinâmica nos próximos ensaios descritos nesse trabalho, garantindo que a curcumina ainda esteja fotoativa nas formulações.

## **5.6. Avaliação biológica *in vitro***

### **5.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Foi realizado o ensaio para a determinação da CIM, de acordo com a metodologia descrita por Salmazi e colaboradores (2015). Os resultados das oito ocasiões serão apresentados a seguir, na Figura 20.

**Figura 20** - Médias e desvio-padrão dos valores de concentração mínima inibitória segundo o tratamento, com e sem a aplicação de luz, obtidos em oito dias diferentes (n=24).



Letras diferentes apontam médias com diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Games-Howell ( $p \leq 0,054$ ). PDT: amostras irradiadas com a dose 10,07 J/cm<sup>2</sup> de luz LED AZUL; Escuro: amostras não irradiadas com luz; DMSO-CUR: curcumina solubilizada em DMSO à 10%; PP-CUR-0%: curcumina incorporada em PP-0%; Miconazol: tratamento realizado com o fármaco miconazol em solução de DMSO 10%.

Neste teste foi possível observar que as maiores concentrações inibitórias mínimas foram obtidas com as amostras de curcumina em DMSO-CUR com irradiação de luz e DMSO-CUR e PP-CUR sem a aplicação de luz, uma vez que apresentaram médias estatisticamente iguais. Salmazi e colaboradores (2015), como já relatado, aplicando o mesmo protocolo de análise, obtiveram resultados semelhantes aos alcançados nesse trabalho quanto a amostra SPCL sem a irradiação de luz, sendo a CIM encontrada pelos autores de 62,5 µg/mL de curcumina frente a *Candida albicans* ATCC 18804. Já quando a curcumina em DMSO 20%, os autores obtiveram uma CIM de 1000 µg/mL, concentração 11 vezes mais elevada que a determinada neste trabalho.

Khan e colaboradores (2012) realizaram a determinação do CIM<sub>90</sub> da curcumina frente a *Candida albicans* ATCC 90028, que é definido como a menor concentração do composto capaz de inibir  $\geq 90\%$  do crescimento do microrganismo em comparação com os controles. Eles observaram que a CIM<sub>90</sub> variou de 250-650 µg/mL de curcumina.

Soria-Lozano e colaboradores (2015) investigaram o efeito da terapia fotodinâmica com diferentes fotossensibilizadores em microrganismos cariogênicos *in vitro*, inclusive a curcumina frente a *Candida albicans* ATCC 1023. Os autores realizaram ensaios para a determinação da concentração fungicida mínima do fotossensibilizador com três diferentes tempos de pré-irradiação: 1 min, 1 e 2 horas com lâmpada de halide ( $37 \text{ J/cm}^2$ ). Os autores não observaram inibição do microrganismo mesmo com a máxima concentração de curcumina, que foi de  $1280 \text{ } \mu\text{g/mL}$ , concluindo que o tempo para observar a inibição, não foi suficiente.

Avaliando apenas as amostras irradiadas ( $10,07 \text{ J/cm}^2$ ), PP-CUR e miconazol tiveram concentrações inferiores as de DMSO-CUR, podendo inferir que a incorporação da curcumina no SPCL apresentou benefício quanto a inibição do microrganismo. Para o miconazol, antifúngico utilizado como comparativo, a irradiação não interferiu em sua efetividade, dado esse já esperado, uma vez o fármaco não apresenta propriedades fotossensíveis.

Como também já descrito nesse trabalho, Dovigo e colaboradores (2011a) relataram que obtiveram resultados favoráveis na inibição de suspensões planctônicas de *Candida albicans* ATCC 90028 tratados com 5 à  $20 \text{ } \mu\text{M}$  de curcumina em DMSO 10%, com a aplicação de luz (dose de  $37,5 \text{ J/cm}^2$ ) e sem a associação da terapia fotodinâmica. A inibição no crescimento de *Candida albicans* se deu com  $5 \text{ } \mu\text{M}$  quando aplicada a luz LED, com decrescente inibição conforme o aumento da concentração e totalmente inativada com  $20 \text{ } \mu\text{M}$  de curcumina. Já quando utilizadas as mesmas concentrações de curcumina (5 à  $20 \text{ } \mu\text{M}$ ) porém sem a irradiação de luz, a inibição não foi efetiva.

Após as 48h de incubação das amostras a serem testadas com a suspensão de *Candida albicans*, foi possível concluir que a curcumina incorporada no sistema e irradiada com luz LED azul ( $10,07 \text{ J/cm}^2$ ) apresentou a mesma efetividade que o controle negativo. Observa-se que o tempo de incubação permitiu a liberação da curcumina e sua ação efetiva esperada.

### **5.6.1. Resultados da avaliação da curcumina incorporada em SPCL frente ao biofilme de *Candida albicans***

As Tabela 8 apresentam os resultados de dois dias independentes, obtidos da avaliação da curcumina incorporada ou não em SPCL.

**Tabela 8** – Avaliação da ação antibiofilme. Valores médios e desvio-padrão em  $\text{Log}_{10}$  (UFC/mL) obtidos em dois dias diferentes ( $n=6$ ), utilizando curcumina 80  $\mu\text{M}$  com tempo de pré-irradiação de 20 minutos e dose de luz de 10,07  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

<b>Placa Escuro</b>				
<b>Estatística</b>	<b>PP-CUR-0%</b>	<b>PP-0%</b>	<b>CUR-DMSO 10%</b>	<b>Controle (PBS)</b>
Média	5,51	5,49	5,18	4,25
Desvio-padrão	0,04	0,23	0,11	1,56
<b>Placa PDT</b>				
<b>Estatística</b>	<b>PP-CUR-0%</b>	<b>PP-0%</b>	<b>CUR-DMSO 10%</b>	<b>Controle (PBS)</b>
Média	5,53	5,45	3,57	5,41
Desvio-padrão	0,05	0,01	1,12	0,00

Os resultados obtidos demonstraram uma discreta redução nas unidades formadoras de colônias do biofilme de *Candida albicans* apenas para a amostra de curcumina em solução de dimetilsulfóxido à 10% irradiada com a luz, uma vez que quando comparado ao grupo controle, apresentou a redução de aproximadamente 2  $\text{log}_{10}$ , porém, salienta-se que com elevado desvio padrão que torna o resultado inconclusivo. A curcumina quando incorporada no SPCL não apresentou o mesmo efeito, dado este que pode estar relacionado a fatores, como baixa concentração de curcumina incorporada ou efeito retardado de liberação das formulações estudadas.

Esse resultado corrobora indiretamente com os dados obtidos no ensaio de liberação, uma vez que nele foi observado que somente após, no mínimo 4 horas em contato íntimo com a membrana, houve início da liberação da curcumina das formulações testadas, por conseguinte, o tempo de contato com as células de *Candida albicans* (20 min de tempo de pré-irradiação) não seria suficiente para haver efeito antifúngico esperado.

Logo, devido aos resultados preliminares negativos obtidos nesse ensaio, associado às limitações enfrentadas para a aplicação desse teste para análise de

formulações farmacêuticas mucoadesivas, houve a necessidade de realizar outro protocolo experimental que permitisse uma observação mais dinâmica de forma a detectar uma concentração inicial de curcumina a ser testada.

#### **5.6.2. Quantificação de atividade metabólica (XTT)**

Com o objetivo de determinar uma concentração de curcumina capaz de inibir biofilmes, foi realizado o ensaio de quantificação de atividade metabólica. Os resultados dos dois dias de experimentos, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9-** Valores das médias da porcentagem de viabilidade dos biofilmes de *Candida albicans*, em RPMI a 37°C, por meio de XTT.

Placa Escura																	
Estatística	RPMI estéril controle	XTT estéril controle	PP-CUR (µg/mL)					DMSO-CUR (µg/mL)				Miconazol (µg/mL)				Controle	DMSO 10%
			1250	625	312,5	156,25	PP-0%	1250	625	312,5	156,25	2081	1040,5	520,25	260,13		
<b>MÉDIA</b>	0,067	0,044	2,179	2,059	1,379	1,329	1,939	0,558	0,911	0,905	0,919	0,178	0,313	0,457	0,725	0,730	0,921
<b>DESVIO-PADRÃO</b>	0,004	0,002	0,165	0,139	0,165	0,073	0,198	0,187	0,107	0,043	0,060	0,056	0,076	0,086	0,235	0,102	0,048
Placa PDT																	
Estatística	RPMI estéril controle	XTT estéril controle	PP-CUR (µg/mL)					DMSO-CUR (µg/mL)				Miconazol (µg/mL)				Controle	DMSO 10%
			1250	625	312,5	156,25	PP-0%	1250	625	312,5	156,25	2081	1040,5	520,25	260,13		
<b>MÉDIA</b>	0,092	0,047	2,202	2,263	1,619	1,352	1,763	0,117	0,280	0,165	0,228	0,133	0,324	0,394	0,556	0,830	0,904
<b>DESVIO-PADRÃO</b>	0,009	0,001	0,145	0,190	0,217	0,069	0,110	0,043	0,237	0,042	0,059	0,063	0,183	0,068	0,126	0,048	0,044

Conforme Salmazi e colaboradores (2015), a concentração inibitória mínima da curcumina veiculada em sistemas precursores de cristais líquidos, frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 18804, sem a irradiação de luz, foi de 62,5 µg/mL. Sabe-se que os microrganismos, quando organizados em biofilmes, apresentam maior resistência a fármacos, podendo ter a concentração inibitória mínima elevada de 10 a 1000 vezes, quando em sua forma planctônica (DICICCO et al., 2012). Portanto, as concentrações escolhidas para o ensaio foram 2,5, 10,5 e 20 vezes a concentração inibitória mínima, resultando em 156,25, 312,5, 625 e 1250 µg/mL de curcumina.

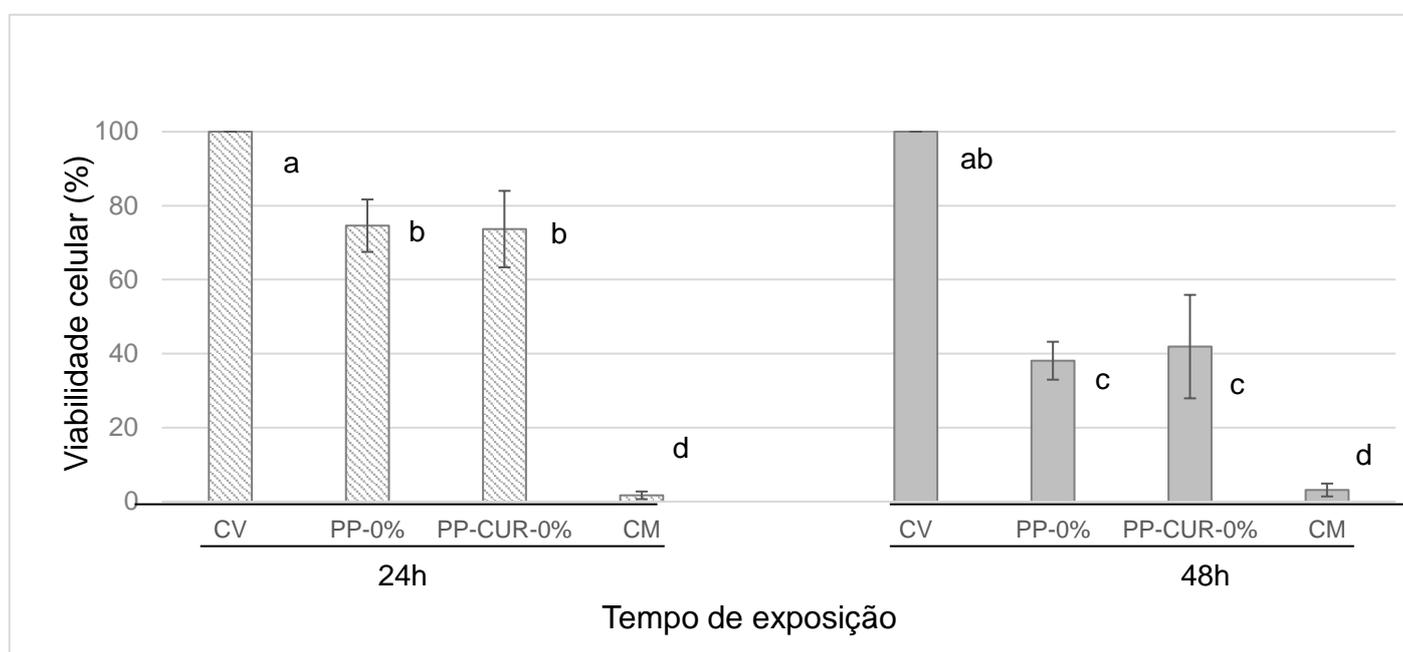
Os valores de absorvância expostos na Tabela 9 apontam que a amostra de curcumina à 1250 µg/mL em solução de DMSO à 10%, sem irradiação de luz, apresentou uma redução da viabilidade do biofilme de *Candida albicans*, uma vez que valores mais baixos de absorvância, quando comparado aos encontrados para o controle, podem ser relacionados diretamente com a baixa atividade metabólica do microrganismo. Para as amostras irradiadas com uma dose de luz 10,07 J/cm<sup>2</sup>, com concentração de curcumina de 156 à 1250 µg/mL, foi observada a redução da viabilidade, quando comparado as amostras entre si de curcumina em solução e em relação ao controle (Abs 0,830 ± 0,048). Ressalta-se que o controle de dimetilsulfóxido à 10% não apresentou nenhuma alteração na viabilidade das células de *Candida albicans*, indicando não ser tóxico ao microrganismo nesta concentração. Também foi possível observar uma redução da viabilidade do biofilme quando aplicado miconazol em solução de DMSO à 10%, de acordo com concentrações entre 2081 à 260,13 µg/mL, independente da irradiação.

Contudo, não foi possível observar diminuição da atividade metabólica da *Candida albicans* quando aplicadas a formulação PP-CUR-0% e PP-0%. Tal evento pode ser dado por um falso positivo, ocasionado pela interferência dos componentes da formulação, durante a leitura da absorvância. Portanto, o teste pode ser considerado limitado quando destinado para a análise de tais amostras.

#### 5.6.4. Viabilidade celular de queratinócitos por intermédio de Alamar Blue

Na Figura 21 mostra o gráfico com os resultados obtidos no teste de viabilidade de células do tipo queratinócitos saudáveis (HaCat), por intermédio do reagente Alamar Blue.

**Figura 21** - Médias e desvio-padrão dos valores de viabilidade de células Hacat segundo o reagente Alamar Blue em dois diferentes tempos de incubação com as amostras testadas, 24 e 48h.



Onde, CM representa o controle de morte das células, ou seja, tratados com Triton X-100 à 9%; CV: controle de células vivas, tratadas com meio de cultura; PP-0%: apenas a formulação; PP-CUR-0%: a curcumina incorporada na formulação.

A citotoxicidade pode ser estipulada de acordo com a comparação do número de células viáveis de um grupo considerado controle, ou seja, que não tenha sido exposto a nenhum tipo de tratamento. Para tal comparação a normalização dos dados, considerando a viabilidade do grupo controle como 100%, estima-se que uma viabilidade de  $\geq 90\%$  indica baixa toxicidade, de 89 a 60% moderada e  $\leq 60\%$  alta toxicidade (SHUBAR et al., 2008).

Foi possível observar que no tempo 24h de incubação as células ainda apresentavam-se viáveis. Porém, ressalta-se que os valores obtidos na

viabilidade entre a formulação e o controle vivo de células apresentaram-se significativamente diferentes.

No tempo 48h de incubação, observou-se que a viabilidade reduziu para menos de 50% quando comparada aos valores obtidos no controle positivo com o mesmo tempo de incubação. Logo, levando em consideração que a formulação será aplicada na cavidade bucal, vários fatores como movimentos da fala ou mastigação e fluxo salivar dificultariam a permanência por um tempo maior que 24h, sendo assim, o tempo 48h foi uma extrapolação na ocasião. No tempo 24h, a viabilidade celular *in vitro* observada de aproximadamente 75%, conforme protocolo adaptado utilizado, o qual permitia a avaliação da viabilidade celular após contato com a formulação sem qualquer tipo de diluição.

Zhang e colaboradores (2012) realizaram teste de citotoxicidade de nanopartículas de PLGA bioadesivas carreadora de insulina para administração oral. A formulação foi diluída em 3 diferentes concentrações, as quais permaneceram em contato com células Caco-2 durante 3h. Os autores relataram que após esse tempo as células ainda apresentavam 85% de viabilidade, sendo assim consideraram o sistema seguro de ser utilizado.

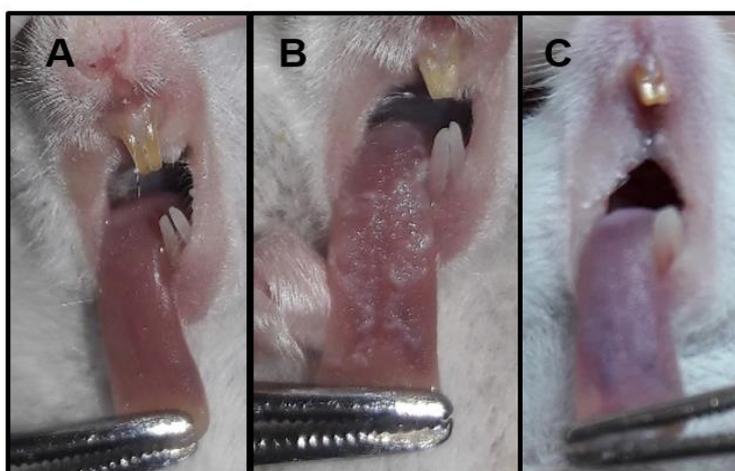
Na literatura, pode-se constatar a biocompatibilidade individual de cada componente presente na formulação desenvolvida. O tensoativo utilizado na composição da formulação PP-0% (PPG-5-Ceteth-20) também foi testado em tecidos SkinEthic™ HCE (modelo composto de queratinócitos humanos modificados, cultivados em filtro inerte de policarbonato), por Alépée e colaboradores (2013). Eles observaram 77,7% de viabilidade celular quando aplicadas amostras de PPG-5-Ceteth-20. Silva e colaboradores (2014) avaliaram o sistema transdérmico baseado em tensoativo para administração cutânea de fluconazol contendo 40% de PPG-5-Ceteth-20, 50% de ácido oleico e 10% de água. Eles observaram na avaliação de segurança das formulações *in vitro* (macrófagos J-774 de ratos) que a formulação (1-18,6  $\mu\text{M}$ ) sem a adição do fármaco em questão apresentava viabilidade celular de 95%. Harvey e colaboradores (2010) investigaram a influência do ácido oleico em ensaio de inibição de crescimento e citotoxicidade em células endoteliais. O lipídeo, que também está presente na membrana celular, mostrou uma viabilidade de 73,5 e 79,5% a concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O polímero poloxamer, utilizado na formulação como potenciador da mucoadesão, também foi

investigado por Kwon e seu grupo de pesquisa (2005) em busca da resposta de sua biocompatibilidade em um hidrogel a 25%. Han e colaboradores (2003) realizaram testes *in vivo* e *in vitro* com hidrogel de poloxamer e concluíram que o gel não é tóxico. Borgheti-Cardoso e colaboradores (2015) desenvolveram e caracterizaram carreadores para administração de siRNA localmente, com base na polietilenimina (PEI). No estudo de biocompatibilidade em ratos concluiu-se que PEI, apesar de ser um componente com propriedades irritantes, apresentou pouca influência sobre o tecido, uma vez que os sistemas com e sem PEI tiveram efeitos semelhantes. Além disso, o gel formado *in situ* após injeção subcutânea foi biodegradável e apresentou baixa toxicidade local.

### 5.7. Testes microbiológicos *in vivo*

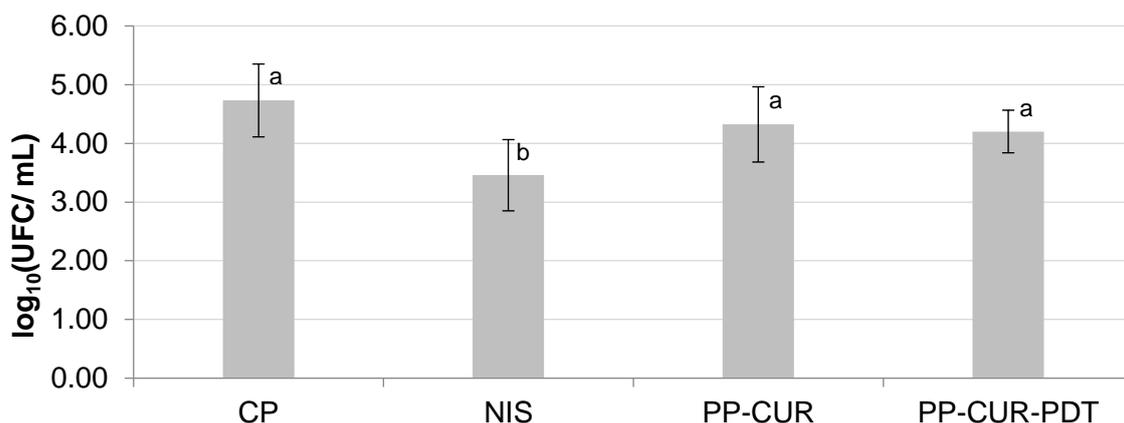
Após a indução de candidose com suspensão de *C. Candida* causada nos animais, foi constatada a lesão causada, conforme pode ser observado na Figura 22.

**Figura 22** - Imagens das línguas de camundongos fêmeas. A: língua de animal saudável. B e C: Manchas brancas ou pseudomembrana presentes no dorso da língua dos animais infectados com *Candida albicans* e não tratadas



Os resultados obtidos após o plaqueamento das amostras coletadas dos camundongos (n=79) após o 24h do período de tratamento (5 dias), estão representados na Figura 23.

**Figura 23** - Médias e desvio-padrão dos valores de  $\log_{10}$ UFC/mL segundo a recuperação realizada em animais após 24h do último tratamento.



Onde, CP representa o controle positivo; NIS: controle negativo, tratadas com suspensão de Nistatina; PP-CUR: formulação incorporada de CUR; PP-CUR-PDT: formulação incorporada de CUR e irradiada com luz LED azul (dose 10,07 J/cm<sup>2</sup>). Letras diferentes apontam médias com diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Tukey ( $p \leq 0,013$ ).

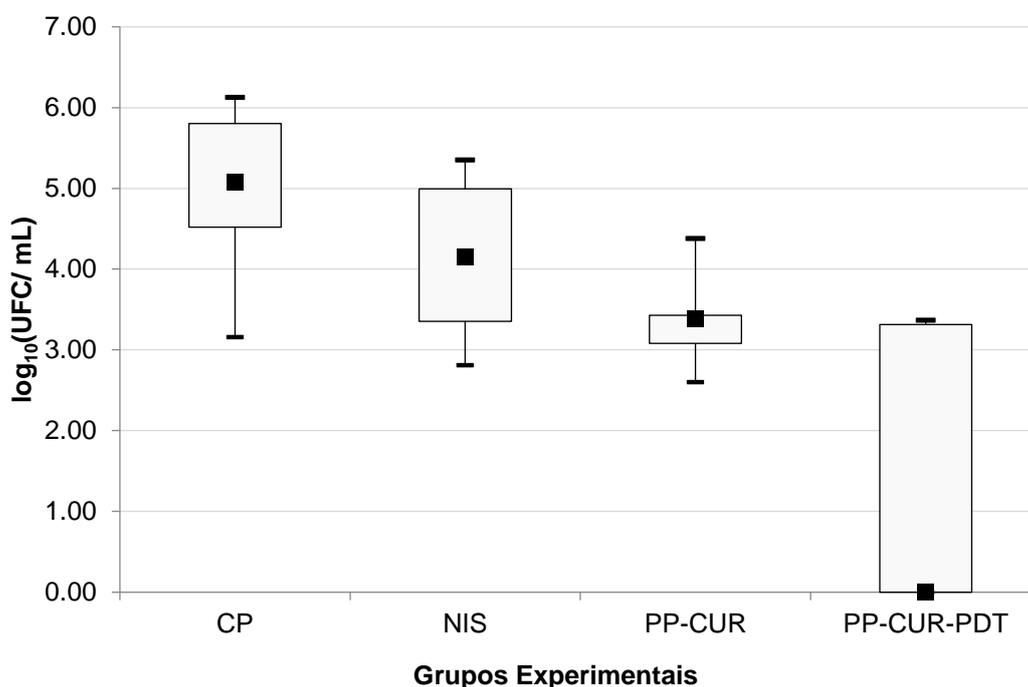
Os animais, após 24h do último dia de tratamento realizado com as amostras propostas, apresentaram em geral uma redução tênue quando comparado ao controle positivo. A análise estatística demonstrou que os animais tratados com Nistatina apresentaram redução significativa em relação aos outros grupos avaliados. O tratamento realizado com a formulação PP-CUR-0% não apresentou diferença significativa após a aplicação da luz LED azul. Assim como nos ensaios *in vitro*, sugere-se que não houve tempo suficiente para a liberação e sucessiva efetividade da curcumina incorporada no sistema. Uma vez que a aplicação *in vivo* implica em barreiras fisiológicas do modelo animal e como a ingestão de ração e água, dificultando a permanência da formulação na cavidade bucal. Ressalta-se que o fluxo salivar nos camundongos é reduzido quando comparado ao de humanos, sendo assim, outro fator limitante para a efetividade da formulação, uma vez que se trata de um SPCL e necessitaria de saliva para transitar de estruturação (de microemulsão para sistema líquido-cristalino), de

modo que aumentasse sua mucoadesividade, conforme observado no ensaio da força mucoadesiva *in vitro*.

Durante o percurso experimental, infelizmente, foi contabilizada a perda de 22 animais no grupo dos animais 7 dias. Ressalta-se que essa perda não sugere nenhuma relação decorrente a um possível efeito adverso ao tratamento, uma vez que houve perda inclusive de animais do grupo controle positivo (n=4). Nos demais grupos, NIS, PP-CUR e PDT houve perda de 6, 5 e 7 animais, respectivamente.

Contudo, após uma análise estatística descritiva dos resultados obtidos, expostos na Figura 24, com os animais eutanasiados após sete dias do último tratamento, pode-se observar uma redução no número de UFC/mL promitente.

**Figura 24** - Mediana dos valores de  $\log_{10}$ UFC/mL segundo a recuperação realizada em animais após sete dias do último tratamento.



Onde, CP representa o controle positivo; NIS: controle negativo, tratadas com suspensão de Nistatina; PP-CUR: formulação incorporada de CUR; PP-CUR-PDT: formulação incorporada de CUR e irradiada com luz LED azul (dose 10,07 J/cm<sup>2</sup>).

Os animais que receberam tratamento com a Nistatina tiveram a mediana do  $\log_{10}$  (UFC/mL) reduzido quando comparado a mediana do controle positivo. O grupo PP-CUR teve uma redução ainda maior, sendo de 1,69  $\log_{10}$  comparado ao grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. E por último, a diferença entre o grupo controle e o grupo PP-CUR-PDT que apesar da elevada variabilidade entre os resultados obtidos dentro desse grupo, foi o que teve maior redução e ainda a maior efetividade entre todos os tratamentos, apresentando inativação total das células de *Candida albicans* recuperadas em três animais, dos cinco estudados.

Essa possível maior efetividade constatada nos animais avaliados após sete dias do último tratamento em relação aos avaliados após 24h do último tratamento corrobora os resultados obtidos análise microbiológica *in vitro*, uma vez que ao aumentar o tempo de contato da formulação com a suspensão de *Candida albicans*, também houve melhoria no tratamento, corroborando também

com os dados obtidos na liberação *in vitro*. Sendo assim, é necessário um tempo maior que 24h para que o fármaco seja liberado e conseqüentemente aja no local administrado.

Após futura solicitação e aprovação ao Comitê de Ética para o pedido de mais 22 animais para a repetição do protocolo experimental, espera-se que esses resultados se tornem conclusivos, uma vez que o número amostral atual foi insuficiente.

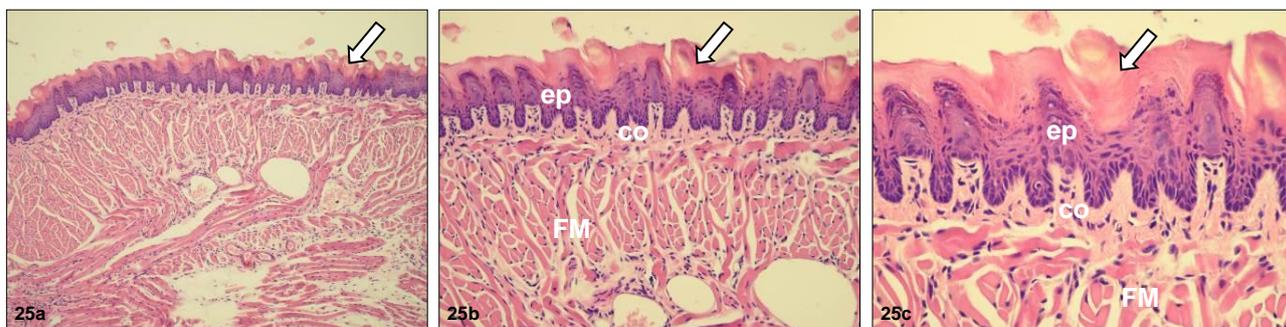
### **5.7.1. Análise histológica**

Os resultados obtidos nas análises histológicas realizadas com as línguas dos camundongos após 24h do último tratamento, descrito no item 4.2.8, estão representadas nas Figuras 24, 25, 26, 27 e 28.

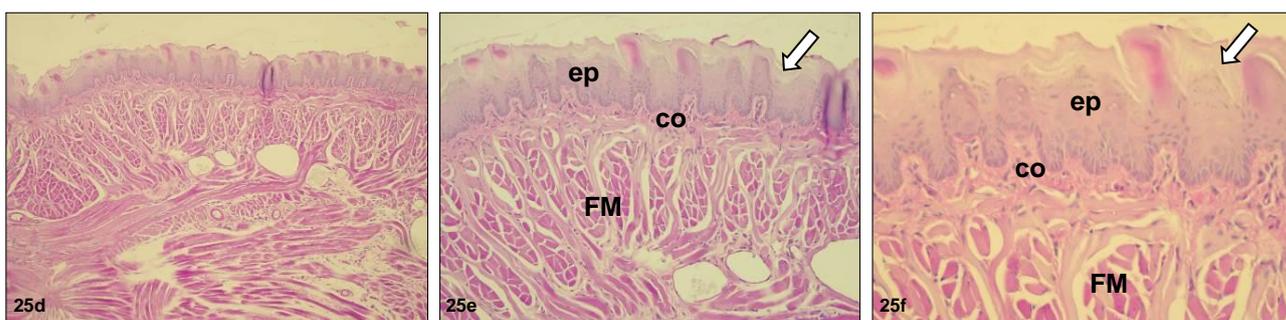
No grupo controle (CN), onde biópsias foram obtidas de animais saudáveis, os quais não foram infectados e nem receberam qualquer tratamento, os tecidos analisados apresentam características histológicas de normalidade (Figura 25a, 25b, 25c, 25d, 25e, 25f). De maneira geral, como apontado por setas brancas, os cortes histológicos exibem epitélio pavimentoso estratificado, com papilas recobertas por homogênea camada de queratina. O tecido conjuntivo subjacente apresenta equilíbrio entre células, pequenos vasos sanguíneos e matriz extracelular (Figura 25c). Na região central da língua há a presença de fibras musculares intactas em meio a vasos sanguíneos de amplo calibre (Figura 25a, 25b, 25d, 25e). Os cortes histológicos submetidos à coloração de Schiff, demonstram que não há qualquer contaminação superficial detectável por esta técnica laboratorial (Figura 25d, 25e, 25f).

**Figura 25** - Fotomicrografias das lâminas do grupo controle negativo (CN). Coloração hematoxilina-eosina (25a, 25b, 25c) e coloração de reativo de Schiff (25d, 25e, 25f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares.

#### Grupo CN (H/E)



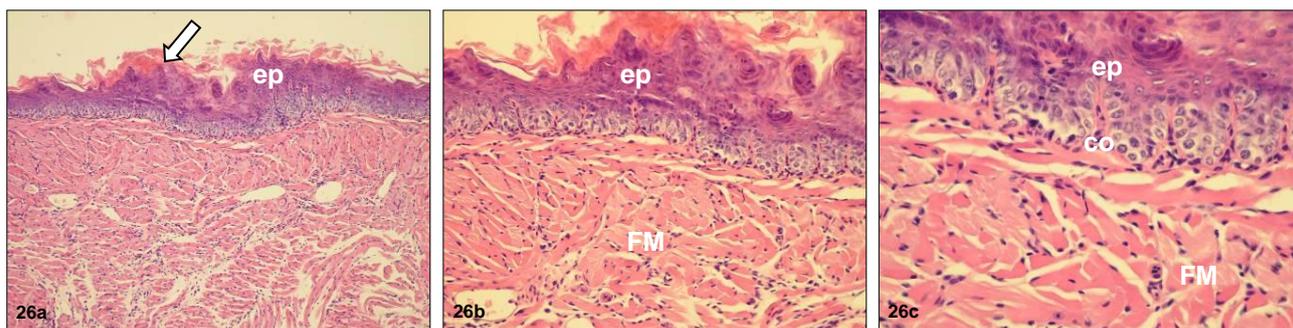
#### Grupo CN (Schiff)



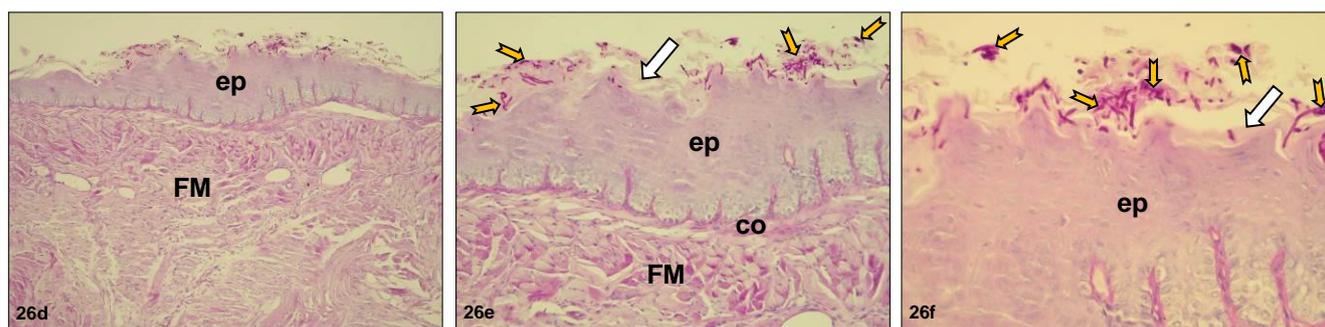
No grupo controle positivo (C), em que biópsias foram obtidas de animais infectados e que não receberam qualquer tratamento, os tecidos analisados apresentam discretas alterações, sendo as mais intensas observadas no tecido epitelial, indicado por setas brancas, o qual exibe áreas de acantose associada à hiperqueratose (Figura 26a, 26b, 26c, 26d, 26e, 26f). Este tecido de revestimento exibe, ainda, alterações em sua estratificação, sendo que apesar da integridade da camada basal, suas células apresentam aumento volumétrico considerável (Figura 26b, 26c). O tecido conjuntivo subjacente, bem como as fibras musculares, exibe características normais. Os cortes histológicos submetidos à coloração de Schiff, demonstram o acúmulo de fungos nas áreas mais superficiais do epitélio, apontado por setas amarelas, particularmente na espessa camada de queratina (Figura 26e, 26f).

**Figura 26** - Fotomicrografias das lâminas do grupo controle positivo (C). Coloração hematoxilina-eosina (26a, 26b, 26c) e coloração de reativo de Schiff (26d, 26e, 26f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares.

#### Grupo C (H/E)



#### Grupo C (Schiff)

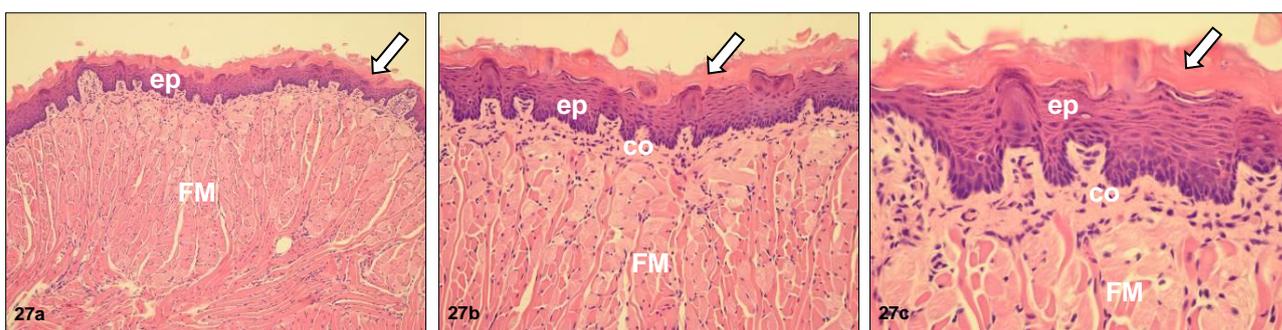


No grupo PP-CUR, onde biópsias foram obtidas de animais infectados e posteriormente tratados apenas com a formulação experimental de curcumina, os tecidos analisados apresentam características histológicas de normalidade (Figuras 27a, 27b, 27c), tal como observado no grupo CN. O epitélio íntegro, indicado por setas brancas, apresenta-se recoberto por homogênea camada de queratina, sendo que o tecido conjuntivo subjacente e as fibras musculares exibem características normais. Porém, tal como observado para o Grupo C, os cortes histológicos submetidos à coloração de Schiff, demonstram a presença de fungos em suas variadas formas, nas áreas mais superficiais do epitélio e também em meio à camada de queratina que reveste o epitélio pavimentoso

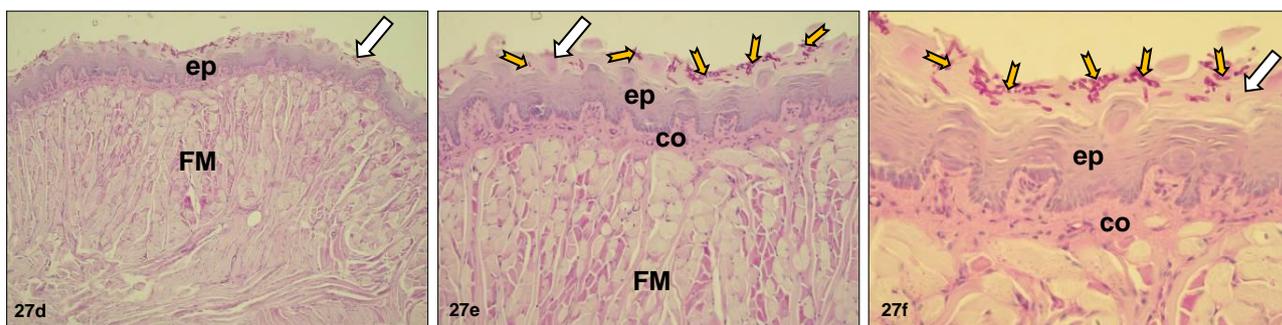
estratificado, evento este que foi apontado por setas amarelas (Figuras 27d, 27e, 27f).

**Figura 27** - Fotomicrografias das lâminas do grupo PP-CUR. Coloração hematoxilina-eosina (27a, 27b, 27c) e coloração de reativo de Schiff (27d, 27e, 27f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares.

#### Grupo PP-CUR (H/E)



#### Grupo PP-CUR (Schiff)



No grupo PP-CUR-PDT, onde biópsias foram obtidas de animais infectados e então submetidos à terapia fotodinâmica, os tecidos analisados não apresentam qualquer alteração da normalidade (Figura 28a, 28b, 28c, 28d, 28e, 28f). Tal como observado no grupo CN, os cortes histológicos exibem epitélio pavimentoso estratificado íntegro, recoberto por homogênea camada de ceratina (setas brancas). O tecido conjuntivo subjacente apresenta equilíbrio entre células, pequenos vasos sanguíneos e matriz extracelular (Figura 28b, 28c), sendo observada na porção central da língua, fibras musculares intactas em meio a vasos sanguíneos de amplo calibre (Figura 28a, 28b, 28c). Os cortes

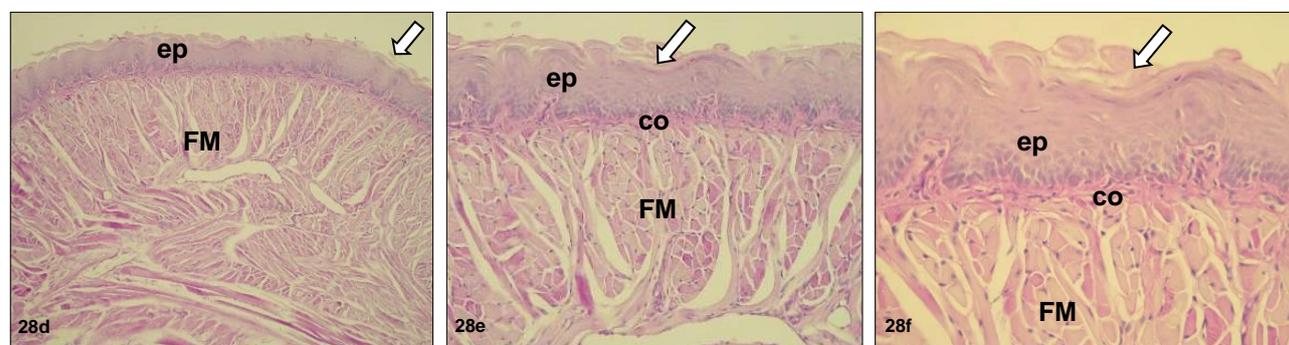
histológicos deste grupo experimental que foram submetidos à coloração de Schiff, exibem um epitélio intacto e recoberto por ceratina livre de contaminação fúngica detectável por esta técnica laboratorial (Figura 28d, 28e, 28f).

**Figura 28** - Fotomicrografias das lâminas do grupo PP-CUR-PDT. Coloração hematoxilina-eosina (28a, 28b, 28c) e coloração de reativo de Schiff (28d, 28e, 28f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares.

#### Grupo PP-CUR-PDT (H/E)



#### Grupo PP-CUR-PDT (Schiff)

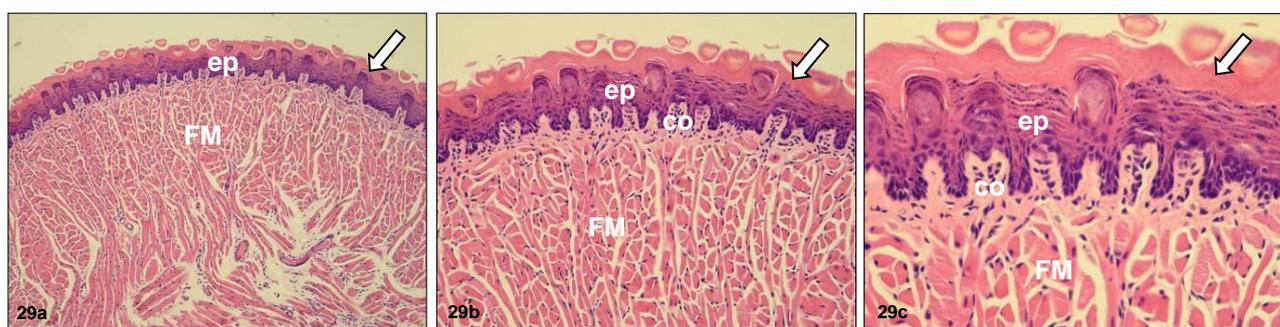


No grupo NIS, no qual biópsias foram obtidas de animais que foram inicialmente infectados e posteriormente submetidos ao tratamento convencional com Nistatina, é possível observar um epitélio íntegro e homogêneo quanto a espessura e morfologia (setas brancas), recobrendo o tecido conjuntivo subjacente normal, sob o qual fibras musculares estão bem dispostas (Figura 29a, 29b, 29c). Estas características histológicas de normalidade tecidual são semelhantes às aquelas observadas nos grupos controle negativo (Figura 29a, 29b, 29c) e experimental PDT (Figura 29a, 29b, 29c). Os cortes histológicos submetidos à

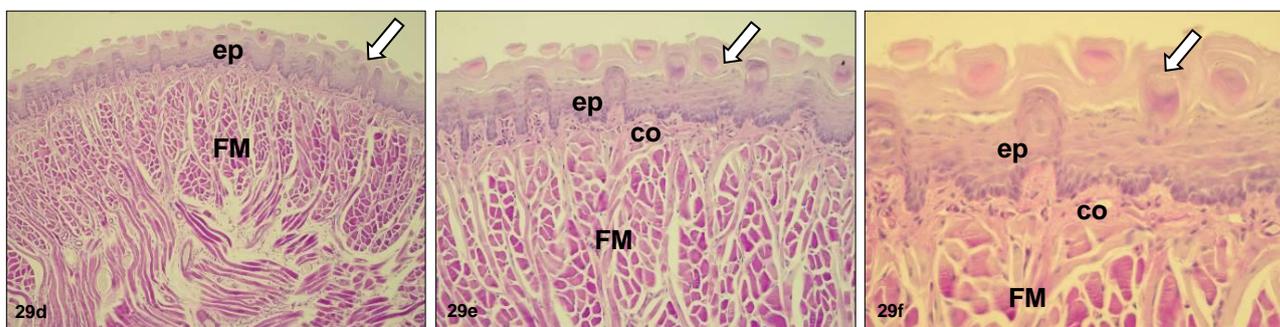
coloração de Schiff exibem um epitélio contínuo e homogêneo (setas brancas), cujas papilas estão recobertas por uma camada de ceratina onde não são detectados fungos no local (Figura 29d, 29e, 29f).

**Figura 29** - Fotomicrografias das lâminas do grupo NIS. Coloração hematoxilina-eosina (29a, 29b, 29c) e coloração de reativo de Schiff (29, 29e, 29f) dos animais eutanasiados após 24h do último tratamento. Onde, ep= tecido epitelial; co= tecido conjuntivo e FM= fibras musculares.

#### Grupo NIS (H/E)



#### Grupo NIS (Schiff)



Os resultados permitem afirmar que os tratamentos realizados com curcumina incorporada no SPCL, com ou sem irradiação de luz LED azul, assim como com a suspensão de Nistatina, não provocaram alterações no tecido da língua dos animais. Apesar de no grupo PP-CUR-PDT não ter tido uma redução significativa no teste de recuperação das células coletadas e contabilizadas em UFC/mL quando comparado aos animais do grupo NIS, o grupo não apresentou fungos em nenhuma das camadas dos tecidos analisados conforme observado nesta análise.

Carmello e colaboradores (2015) realizaram estudos com o mesmo protocolo para a avaliação do fotossensibilizador Photodithazine® associada a terapia fotodinâmica e também puderam observar que na análise histopatológica a presença de pseudo-hifização da *Candida albicans* no tecido do dorso da língua dos animais. Também relataram que no grupo de animais que apenas receberam a irradiação de luz da terapia fotodinâmica não afetou a integridade do tecido.

Em estudo realizado por Dovigo e colaboradores (2013) testaram a curcumina em DMSO 10% em diferentes concentrações camundongas e constataram que na concentração de 80 µM com irradiação 37,5 J/cm<sup>2</sup>, apenas um animal foi possível a observação de alguma levedura no tecido observado, porém no restante dos animais desse mesmo grupo (quatro animais) não evidenciaram qualquer presença de levedura. Nos animais que foram inoculados com *Candida albicans* e que os autores não aplicaram nenhum tipo de tratamento, considerados como controle positivo, observou-se a presença de leveduras e pseudo-hifas na camada queratinizada do dorso da língua dos animais, mas nenhuma evidência de invasão em camadas profundas do epitélio. Relataram também que no tecido conjuntivo subjacente dos animais considerados controle positivo, exibiu resposta inflamatória leve mediada por células mononucleares.

## 6. CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos até o presente momento, conclui-se que:

- A obtenção de sistemas precursores de cristais líquidos foi possível utilizando Procetyl AWS (tensoativo), ácido oleico (fase oleosa) e dispersão de polietilenoimina 0,5% ou dispersão de poloxamer 407 16% (fase aquosa), e também com a união desses dois polímeros, constituindo microemulsões e sistemas líquido-cristalinos a começar com 10% de tensoativo e a elevação sucessiva de fase aquosa, a qual foi correlacionada com a transição das estruturas.

- Após a adição da saliva artificial nos sistemas precursores de cristais líquidos, foi possível observar a transição para sistemas de cristais líquidos, aumentando a força mucoadesiva e tornando os sistemas mais favoráveis a serem aplicados na cavidade bucal.

- Com base nos resultados obtidos, a irradiação com LED até o T10, para aplicação da terapia fotodinâmica garante que a curcumina ainda permaneça fotoativa nas formulações.

- Todos os sistemas desenvolvidos (PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PP-CUR-0% e PP-CUR-50%) apresentaram controle da liberação da curcumina em relação a solução receptora.

- Nenhum dos sistemas avaliados (PEI-CUR-0%, PEI-CUR-50%, PLU-CUR-0%, PLU-CUR-50%, PP-CUR-0% e PP-CUR-50%) foram capazes de permear a mucosa esofágica suína durante as 24 horas de análise.

- A determinação da concentração mínima inibitória apontou que a formulação PP-CUR-0% apresentou ação contra a *Candida albicans* em suspensão planctônica de no mínimo 34,17 µg/mL sem luz e 20,25 µg/mL com a irradiação de luz LED 10,07 J/cm<sup>2</sup>.

- O ensaio antifúngico *in vitro* evidenciou que a curcumina incorporada, 80  $\mu$ M, na formulação PP-0%, com (20 min de TPI) ou sem a aplicação de luz e não apresentou ação em biofilme de *Candida albicans*. Com o aumento da concentração da curcumina, utilizando a técnica de atividade oxidativa, foi possível observar uma redução na atividade metabólica das células de *Candida albicans*, com e sem a terapia fotodinâmica, porém o ensaio apresentou limitações para analisar sistemas de liberação que apresentem opacidade.
- A avaliação da citotoxicidade em células do tipo HaCat, mostrou que a formulação PP-CUR e PP apresentaram viabilidade de 75% quando comparadas as células controle positivo após 24h em contato com as amostras no em transwell.
- No ensaio *in vivo*, a formulação PP-CUR associada ou não à terapia dinâmica teve resultado estatisticamente igual ao controle positivo, não sendo possível a observação de redução microbiana após 24h ao tratamento. Porém, aferindo os resultados obtidos até o momento com animais que foram eutanasiados após 7 dias de tratamento, pode-se observar uma promitente redução em alguns dos animais tratados com a formulação desenvolvida, tornando ainda assim, promissor o tratamento proposto.
- A análise histológica, mostrou que a formulação não apresentou qualquer prejuízo nos tecidos avaliados dos animais saudáveis que foram tratados apenas com a mesma, com isso, pode-se inferir de maneira indireta que a formulação desenvolvida não apresentou citotoxicidade no ensaio *in vivo*.
- Por fim, a formulação desenvolvida em geral apresenta-se promissora como sistema de liberação de fármacos para estudos futuros, não só para aplicação na via bucal, mas também para outras vias de administração que contenha fluidos corporais, tais como via ocular, nasal, vaginal e retal.
- Diante disso, como perspectivas futuras, o sistema desenvolvido e caracterizado deve ainda ter continuidade do ensaio *in vivo*, com o número de animais perdidos durante o experimento para maior segurança dos resultados. Sugere-se também,

visando a futura aplicação clínica, a avaliação da aceitabilidade, uma vez que a adesão do paciente ao tratamento está inclusive relacionada a boa receptividade quanto ao sabor, se fazendo talvez necessário a correção com edulcorantes.

## 7. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B.; SUDARAM, C.; MALANI, N. ICHIKAWA, H. Curcumin: The Indian solid gold. **Adv Exp Med Biol.**, v. 595, p. 1-75, 2007.

ALÉPÉE, N.; BESSOU-TOUYA, S.; COTOVIO, J.; DE SMEDT, A.; DE WEVER, B.; FALLER, C.; JONES, P.; LE VARLET, B.; MARREC-FAIRLEY, M.; PFANNENBECKER, U.; TAILHARDAT, M.; VAN GOETHEM, F.; MCNAMEE, P. Cosmetics Europe multi-laboratory prevalidation of the SkinEthic™ reconstituted human corneal epithelium test method for the prediction of eye irritation. **Toxicol. in vitro**, v. 27, n. 5, p. 1476–1488, 2013.

ÁLVARES; C.A. SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ANDRADE, M.C.; RIBEIRO, A.P.D.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.L.; GIAMPAOLO, E.T.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**. v. 58, n. 2, p. 200–210, 2013.

AMESCUA, G.; ARBOLEDA, A.; NIKPOOR, N.; DURKEE, H.; RELHAN, N.; AGUILAR, M.C.; FLYNN, H.W.; MILLER, D.; PAREL, J.M. Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy: A Novel Treatment for Resistant *Fusarium* Keratitis. **Cornea.**, v. 36, n. 9, p. 1141–1144, 2017.

BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. 1ª edição. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008.

BAEK, E.J.; SHIN, B.K.; NHO, Y.C.; LIM, Y.M.; PARK, J.S.; PARK, J.S.; HUH, K.M. Preparation of poloxamer-based hydrogels using electron beam and their evaluation for buccal mucoadhesive drug delivery. **Polymer Korea**, v.36, n.2, p.182-189, 2012.

BARRY, J.; FRITZ, M.; BRENDER, J.R.; SMITH, P.E.; LEE, D.K. RAMAMOORTHY, A. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. **J Am Chem Soc.**, n. 131, n. 12, p. 4490-4498, 2009.

BHAVANA, S.; NAHAR, P.; LAKSHMI, C.R.; KILARU, N.B.; VEMUGUNTA, R. A Randomized clinical trial to assess and compare the antimicrobial activity of plants of LYTHRACEAE family with hiora mouth washes in subjects with chronic periodontitis – “unveiling the unseen effects”. **Int J Pharm Sci Res.**, v. 31, p. 2184-2193, 2017.

BECHTOLD, I.H. Liquid crystals: A complex system of simple application. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, v. 27, n. 3, p. 333 - 342, 2005.

BERNEGOSI, J; CALIXTO, G.; SANCHES, P. R. S.; FONTANA, C. R.; CILLI, E. M.; GARRIDO, S. S.; CHORILLI, M. Peptide KSL-W-loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative against multi-species oral biofilm. **Molecules**, v. 21, p. 1-14, 2016.

BOYD, B.J.; WHITTAKER, D.V.; KHOO, S.M.; DAVEY, G. Hexosomes formed from glycerate surfactants – formulation as a colloidal carrier for irinotecan. **Int J Pharm.**, v. 318, n. 1–2, p. 154 - 162, 2006.

BORGHETI-CARDOSO, L.N.; DEPIERI, L.V.; KOOIJMANS, S.A.; DINIZ, H.; CALZZANI, R.A.; VICENTINI, F.T.; VAN DER MEEL, R.; FANTINI, M.C.; IYOMASA, M.M.; SCHIFFELERS, R.M.; BENTLEY, M.V. An *in situ* gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **Eur J Pharm Sci.** v. 10, n. 74, p.103-117, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. da Diretoria Colegiada - RDC nº 166. Guia para validação de métodos analíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 25 julho de março de 2017.

BRUNETTI, M.C. **Periodontia médica**: uma abordagem integrada. São Paulo, Senac, p. 53, 2004.

BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P.; JONES, D. S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.

CAFAGGI, S.; LEARDI, R.; PARODI, B.; CAVIGLIOLI, G.; RUSSO, E.; BIGNARDI, E. Preparation and evaluation of a chitosan salt–poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. **J Control Release**, v. 102, p. 159 – 169, 2005.

CALIXTO, G.M.F. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans*. 2013. 105 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

CARMELLO J.C.; ALVES, F.; BASSO, F.G.; COSTA, C.A.S.; BAGNATO, V.S.; MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- Mediated photodynamic therapy *in vivo*. **PloS One**, v.11, n. 6, p.1-18, 2016.

CARVALHO, F.C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. 2009. 143 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

CARVALHO, F.C. Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina. 2012. 163 p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

CARVALHO, F.C.; BARBI, M.S; SARMENTO, V.H.; CHIAVACCI, L.A.; NETTO, F.M.; GREMIÃO, M.P. Surfactante systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J Pharm Pharmacol.**, v.62, p.439-439, 2010.

CARVALHO, F.C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v 1, 2013, 219–227, 2012.

CARVALHO, F.C.; CHORILLI; M.; GREMIÃO, M.P.D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Pol.**, v.24 n.2, 2014.

CARVALHO, F.C.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.S.; BARBI, M.; GREMIÃO, M.P.D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v. 5, p. 2367 – 2374, 2010.

CHANDRA, J.; MUKHERJEEL, P.K.; LEIDICHL, S.D.; FADDOUL, F.F.; HOYER, L.L.; DOUGLAS, L.J.; GHANNOUML, M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **J Dent Res** v. 80, n. 3, 2001.

CHASSAGNEZ, A.L.M.; CORRÊA, N.C.F.; MEIRELES, M.A.A. Extração de oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa L*) com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 17, n. 4, 1997.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CHORILLI, M.; RIGON, R.B.; CALIXTO, G.; CARTEZANI, P.M.; RIBEIRO, M.C. A.P.; POLACOW, M.L.O.; CERRI, P.S.; SARMENTO, V.H.; SCARPA, M.V. Rheological characterization and safety evaluation of non-Ionic lamellar liquid

crystalline systems containing retinyl palmitate. **J. Biomed. Nanotech.**, v. 12, p. 394 - 403, 2016.

CIEPLIK, F.; STEINWACHS, V.S.; MUEHLER, D.; HILLER, K.A.; THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G.N.; BUCHALLA, W.; MAISCH, T. Phenalen-1-one-Mediated Antimicrobial photodynamic therapy: antimicrobial efficacy in a periodontal biofilm model and flow cytometric evaluation of cytoplasmic membrane damage. **Microbiol.**, v. 9, p. 1-13, 2018.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos*, p. 77-85, 2004.

COSTA, P.J.C. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 2, 2002.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.13, p. 123–133, 2001.

GONZÁLEZ-DELGADO, J.A.; CASTRO, P.M.; MACHADO, A.; ARAÚJO, F. RODRIGUES, F.; KORSAK, B.; FERREIRA, M.; TOMÉ, J.P.C.; SARMENTO, B. Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. **Int J Pharm.** v. 510, n. 1, p. 221-231, 2016.

DE FOGGI, C.C.; MACHADO, A.L.; ZAMPERINI, C.A.; FERNANDES, D.; WADY, A.F.; VERGANI, C.E. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. **J Investig Clin Dent.**, v. 7, p. 141–148, 2016.

DE ROSSI S.S., CIARROCCA K. Oral Candidiasis. In: Ferreira J., Friction J., Rhodus N. (eds) *Orofacial Disorders*. Springer, 2017.

DICICCO, M.; NEETHIRAJAN, S.; SINGH, A.; WEESE, J.S. Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Veterinary Research.**, v. 8, n. 225, p. 1-7, 2012.

DOVIGO, L.N.; CARMELLO, J.C.; COSTA, C.A.S.; VERGANI, C.E.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medic. Mycol.**, v. 51, p. 243–251, 2013.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; CARMELLO, J.C.; MACHADO, A.L.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of Clinical Isolates of *Candida* to Photodynamic Effects of Curcumin. **Lasers Surg Med**, v. 43, p. 927-934, 2011a.

DOVIGO, L.N., PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.D.; BRUNETTI, I.L.; COSTA, C.A.S.; JACOMASSI, D.P.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochem. Photobiol.**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011b.

DOS SANTOS RAMOS, M.A.; CALIXTO, G.; DE TOLEDO, L.G.; BONIFÁCIO, B.V.; DOS SANTOS, L.C.; DE ALMEIDA, M.T.; CHORILLI, M.; BAUAB, T.M. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **Int J Nanomedicine.**, v. 16; n. 10, p. 7455-7466, 2015.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. Phototherapy. **Na Bras Dermatol.**, v. 81, n. 1, p. 74-82, 2006.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm. Res.**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

FONSECA-SANTOS, B. Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal. 2015. 115 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M.P.D.; CHORILLI, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals *in vitro* performance tests. **Arab. J. Chem.**, 2016.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; SILVA JÚNIOR, A.A.; GREMIÃO, M.P.D., OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 03, jul./set., 2005

FUJIMURA, A. T. Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquidocristalinos para incorporação do trans-resveratrol: ensaios de permeação cutânea *in vitro* e avaliação da eficácia *in vivo*. 2014. 00 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

GONÇALEZ, M.L. Avaliação do potencial de nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas para incorporação de curcumina no tratamento tópico do melanoma. Dissertação de Mestrado. 2015. 72 p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Farmacêuticas Câmpus de Araraquara.

GONZALES, F.P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biol.**, v. 116, p. 1-10, 2012.

GUO, Y.; ROGELJ, S.; ZHANG P. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria. **Nanotechnology**, v. 21, n. 6, 2010.

HAN, Y.K.; KWON, J.W.; KIM, J.S.; CHO, C.S.; WEE, W.R.; LEE, J.H. *In vitro* and *in vivo* study of lens refilling with poloxamer hydrogel. **Br J Ophthalmol**, v. 87, p. 1399-1402, 2003.

HARVEY, K.A.; WALKER, C.L.; XU, Z.; WHITLEY, P.; PAVLINA, T.M.; HISE, M.; ZALOGA, G.P.; SIDDIQUI, R.A. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. **J. Lipid Res.**, v. 51, p. 3470-3480, 2010.

HEARNDEN, V. SANKAR, V.; HULL, K.; JURAS, D.V.; GREENBERG, M.; KERR, A. R.; LOCKHART, P. B.; PATTON, L. L.; PORTER, S.; THORNHILL, M. H. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 16-28, 2012.

HOKARI, T.; MOROZUMI, T.; KOMATSU, Y.; SHIMIZU, T.; YOSHINO, T.; TANAKA, M.; TANAKA, Y.; NOHNO, K.; KUBOTA, T., YOSHIE, H. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and local administration of minocycline on clinical, microbiological, and inflammatory markers of periodontal pockets: A pilot study. **Int J Dent**, 2018.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciênc Farm Básica Ap.**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JERE, D.; JIANG, H.L.; KIM, Y.K.; AROTE, R.; CHOI, Y.J.; YUN, C.H.; CHO, M.H.; CHO, C.S. Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. **Int J Pharm**, v. 378, p. 194-200, 2009.

JONES, D.; BRUSCHI, M.L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.; ANDREWS, G.P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int J Pharm.**, v. 372, p. 49-58, 2009.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. **Pharm Res.**, v. 14, n. 4, p. 450-457, 1997.

KHAN, N.; SHREAZ, S.; BHATIA, R.; AHMAD, S.I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L.A. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, v. 83, p. 434–440, 2012.

KNOKE, M.; BERNHARDT, H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. **Mycoses.**, v. 49, n. 4, p. 283-287, 2006.

KOOP, H. S., FREITAS, R. A., SOUZA, M. M., SAVI-JR, R., SILVEIRA, J. L. M. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p 229–236, 2015.

KWON, J.W.; HAN, Y.K.; LEE, W.J.; CHO, C.S.; PAIK, S.J.; CHO, D.I.; LEE, J.H.; WEE, W.R. Biocompatibility of poloxamer hydrogel as an injectable intraocular lens. **J Cataract Refract Surg.** v. 31, n. 3, p. 607-13, 2005.

LAHOUD, M.H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. *Visão Acadêmica*, v.11, n.1, p. 65-73, 2010.

LEHMANN, O.Z. **Phys.Chem.**, v. 4, p. 462, 1889.

LOPES, L.B.; SPERETTA, F.F.F.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **Eur J Pharm Sci.**, v. 32, n. 3, p. 209–215, 2007.

LOHSE, M.B.; GULATI, M.; JOHNSON, A.D.; NOBILE, C.J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol.**, v. 16, p. 19–31, 2018.

MAIA, S.R.; FERREIRA, A.C.; ABREU, L.R. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciênc. Agrotec.**, v.28, p. 358-365, 2004.

MANAIA, E.B. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para proteção solar e liberação controlada de terpinem4-ol. 2012. 91 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).

MARQUES, M.R.C.; LOEBENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolution Technologies**, p. 15-28, 2011.

MARTINS, C.V.B.; DA SILVA, D.L.; NERES, A.T.M.; MAGALHAES, T.F.F.; WATANABE, G.A.; MODOLO, L.V.; SABINO, A.A.; DE FATIMA, A.; DE RESENDE, M.A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 337–339, 2009.

MATHEWS, J.L.; NEWMAN, J.T.; SOGANDARES –BERNAL, F.; JUDY, M.M.; SKILES, H.; LEVESON, J.E.; MARENCO-ROWE, A.J.; CHANH, T.C. Photodynamic therapy of viral contaminants with potential for blood banking applications. **Transfusion.**, 28, 1, p. 81-83, 1988.

MAZZARINO, L.; LOCH-NECKEL, G.; BUBNIAK, L. D. S.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, M. C.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 781-791, 2015.

MIMA, E.G.O.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; VERGANI, C.E.; COSTA, C.A.S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 109, p. 392-401, 2010.

NEELOFAR, K.; SHREAZ, S.; RIMPLE, B.; MURALIDHAR, S.; NIKHAT, M.; KHAN, L.A. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. **Can J Microbiol.**, v. 57, n. 3, p. 204-210, 2011.

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 26, n. 3, p. 387–399, 2001.

NOCIARI, M.M.; SHALEV, A.; BENIAS, P.; RUSSO, C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v. 213, n. 2, p. 157-167, 1998.

OLIVEIRA, A. G; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: LI, S. Current Focus on Colloids and Surfaces. Kerala: Transworld Research Network, 2009. p. 57-84.

OYAFUSO, M.H.; CARVALHO, F.C.; CHIAVACCI, L.A.C.; GREMIÃO, M.P.D.; CHORILLI, M. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 14, p. 1–10, 2014.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 44-50, 2006.

PESTANA, K.C. Microemulsões biocompatíveis de anfotericina b para administração oral estudo estrutural, liberação *in vitro* e farmacocinética pré-clínica. 2009. 109 p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ciências Farmacêuticas (Araraquara – Brasil).

PIZZO, G.; LA, C.M.; LICATA, M.E.; PIZZO, I.; D'ANGELO, M. The effects of an essential oil and an amine fluoride/ stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth. **J Periodontol.**, v. 79, n. 7, p. 1177-1183, 2008.

PRAÇA, F.S.G. Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. 2010. 84 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ribeirão Preto - Brasil).

RAJABALAYA, R.; MUSA, M.N.; KIFLI, N.; DAVID, S.R. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. **Drug Des Devel Ther.**, v. 11, p. 393-406, 2017.

RAMIREZ-GARCIA, A.; REMENTERIA, A.; AGUIRRE-URIZAR, J.M.; MORAGUES, M.D.; ANTORAN, A.; PELLON, A.; ABAD-DIAZ-DE-CERIO, A.; HERNANDO, F.L. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? **Crit Rev Microbiol.**, v. 25, p. 1-13, 2014.

REINITZER, F. Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins. **Mh. Chem.** v. 9, p. 421 1888.

RIGON, R.B. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de trans-resveratrol. 2013. 156 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ciências Farmacêuticas (Araraquara – Brasil).

ROSSETTI, F.C.; FANTINI, M.C.A.; CAROLLO, A.R.H.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: evaluation of drug and pharmaceutical additives influence on the internal structure. **J Pharm Sci.**, v. 100, n. 7, p. 2849–2857, 2011.

SAKIMA, V.T. Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral. 2017. 72 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia (São Paulo – Brasil).

SALMAZI, R.; CALIXTO, G., BERNEGOSSI, J.; RAMOS, M.A.; BAUAB, T.M.; CHORILLI, M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system

for the treatment of vaginal candidiasis. **Int J Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 4815-4824, 2015.

SAVIC, S.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; REICHL, S.; TAMBURIC, S.; GOYMANN, C.M. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011.

SCHERMA, A.P.; SANTOS, D.V.O.; JORGE, A.O.C.; ROCHA, R.F. Presença de *Candida* spp. Na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. **Cienc Odontol Bras.**, v.7, n.3, p. 79-86, 2004.

SCHMITT, F.; BARRY, N.P.E.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; THERRIEN, B. Efficient photodynamic therapy of cancer using chemotherapeutic porphyrin-ruthenium metalla-cubes. **Bioorg Med Chem Lett.** v.22, n.1, p.178-80, 2012.

SCHRAMM, G. Reologia e Reometria. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artiber, 2006.

SHARMA, R.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, 1955–1968, 2005.

SHARMA, M.; MANOHARLAL, R.; PURI, N.; PRASAD, R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Biosci. Rep.**, v. 30, p. 391–404, 2010.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **Int. J. Pharm.**, v. 418, p. 6-12, 2011.

SILVA, P.B.; DE FREITAS, E.S.; BERNEGOSSI, J.; GONÇALEZ, M.L.; SATO, M.R.; LEITE, C.Q.; PAVAN, F.R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis--A Review. **J Biomed Nanotechnol.**, v. 12, n. 2, p. 241-260, 2016.

SORIA-LOZANO, P.; GILABERTE, Y.; PAZ-CRISTOBAL, M.P.; PÉREZ-ARTIAGA, L.; LAMPAYA-PÉREZ, V.; APORTA, J.; PÉREZ-LAGUNA, V.; GARCÍA-LUQUE, I.; REVILLO, M.J.; REZUSTA, A. *In vitro* effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiol.**, v.15, p. 187, 2015.

STRAMANDINOLI, R.T.; SOUZA, P.H.C.; COUTO, H.C., WESTPHALEN, F.H, BISINELLI, J.C. IGNÁCIO, S.A.; YURGEL, L.S. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Rev Sul-Bras Odontol.** vol.1, p. 6672, 2010.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G.P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; DE LIMA, M.E.F. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Quim. Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

TAKAKURA, N.; SATO, Y.; ISHIBASHI, H.; OSHIMA, H.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol Immunol.** v. 47, n. 5, p. 321-326, 2003.

VARUM, F.O.; BASIT, A.W., SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 4, 2008.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current Status of Drug Delivery Technologies and Future Directions. **Pharmaceutical Technology**, v. 25, n. 2, p. 1–14, 2001.

WANG, Y.J.; PAN, M.H.; CHENG, A.L.; LIN, L.I.; HO, Y.S., HSIEH, C.Y.; LIN, J.K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, n. 12, p. 1867-1876, 1997.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARTY, D.W.S.; KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review:

Part1. Factors influencing distribution of *candida* species in the oral cavity. **Aust Dent J.**, v. 43, n. 1, p. 45–50,1998.

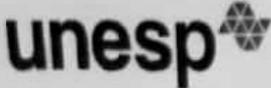
WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M.A. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontol.** 2000, v. 55, p. 250–265, 2011.

YU, T.; ANDREWS, G. P.; JONES, D. S. Mucoadhesion and Characterization of Mucoadhesive Properties. In: NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals Biology, Challenges and Strategies. London: Springer, 2014. p. 35-58.

ZHANG, X.; SUN, M.; ZHENG, A.; CAO, D.; BI, Y.; SUN, J. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 45, p. 632–638, 2012.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo I – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
 Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada ***"POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CURCUMINA INCORPORADA EM SISTEMA PRECURSOR DE CRISTAL LÍQUIDO MUCOADESIVO PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE BUCAL EM CAMUNDONGOS"***, registrada com o nº 23/2017, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Livia Nordi Dovigo** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 13/09/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/Swiss mice
Nº de animais	101
Peso/Idade	20-25 g/ 05 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério de Botucatu – UNESP

  
**Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI**  
 Vice-Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
 Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP  
 5º andar - fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@foar.unesp.br - home page: http://www.foar.unesp.br