



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Vinicius Tatsuyuji Sakima

**Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por
Curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”



Faculdade de Odontologia de Araraquara

Vinicius Tatsuyuji Sakima

**Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por
Curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

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

Araraquara

2017

Sakima, Vinicius Tatsuyuji

Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por Curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral / Vinicius Tatsuyuji Sakima. -- Araraquara: [s.n.], 2018
69 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Nanopartículas 2. Queratinas 3. Camundongos 4. Candida albicans I. Título

Vinicius Tatsuyuji Sakima

**Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por
Curcumina nanoparticulada em modelo Murino de candidose oral**

Comissão Julgadora

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo

3º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Nepplenbroek

Araraquara, 31 de julho de 2017

Vinicius Tatsuyuji Sakima

NASCIMENTO: 27/01/1990–Araraquara, São Paulo, Brasil

FILIAÇÃO: Tatsunobo Sakima

Edna Shisue Simabukulo Sakima

2010 a 2014: Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo - USP

2015 a 2017: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Tatsunobo Sakima** e **Edna Shisue Simabukulo Sakima**, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Aos meus irmãos, **Victor Tatsuyuri Sakima** e **Sarah Ayumi Sakima**, que sempre me apoiaram nos momentos difíceis, me dando força e coragem. E principalmente, a minha namorada maravilhosa e querida, **Marcela Borsatto Queiroz**, que sempre esteve presente ao meu lado, me proporcionando felicidade, amor e carinho.

Agradecimentos Especiais

Agradeço principalmente, ao meu professor orientador **Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por acreditar em meu potencial como aluno de pós-graduação, pela paciência e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades.

Ao Professor **Dr. Paulo Sergio Cerri**, que contribui com muito conhecimento em todas as etapas histológicas, enriquecendo o trabalho.

A **Paula Aboud Barbugli** que me ensinou grande parte metodológica da pesquisa, aprendi muito com você durante esta longa caminhada!

Ao **Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez**, **Geisiane Helena Gomes Bueno** e **Juliana Cabrini Carmello** que me ajudaram em diversas etapas da pesquisa.

A **CAPES**, pela bolsa concedida no **Programa de Pós-graduação de Reabilitação Oral**, que apoiou o desenvolvimento dessa pesquisa.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro concedido na forma do auxílio à pesquisa (Processo 2013/ 23165-5) que permitiu a realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro concedido na forma de auxílio à pesquisa (Processo 446401/2014-5) que permitiu a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Aos meus pais **Tatsunobo Sakima** e **Edna Shisue Simabukulo**, que sempre me incentivaram a e nunca mediram esforços para o meu sucesso.

Aos meus avós, **Fernando** e **Shigue** que sempre rezaram e torceram por mim.

Aos meus irmãos, **Victor Tatsuyuri Sakima** e **Sarah Ayumi Sakima**, pela força e coragem.

A minha namorada querida, **Marcela Borsatto Queiroz**, que esteve presente em todos os momentos incríveis da minha vida e nunca deixou de acreditar no meu potencial!

A minha cunhada **Andressa Rosa Perin Leite**, um exemplo de pessoa!

A todos os meus amigos do Laboratório de microbiologia, em especial **Jéssica Bernegossi** e **Kássia Dias**, pela parceria e companhia!

A todos os **professores** do departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pelo conhecimento adquirido.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara – **UNESP/FOAr**.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas **FCFAr** e ao Instituto de Física – **USP/São-Carlos**, por oferecer os equipamentos.

Por fim, a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com minha formação acadêmica.

“Ser grande, é abraçar uma grande causa”

William Shakespeare

Sakima VT. Avaliação antifúngica e de citoqueratinas epiteliais após terapia fotodinâmica mediada por Curcumina nanoparticulada em modelo murino de candidose oral [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos fotodinâmicos da curcumina (CUR) encapsulada em nanopartículas poliméricas (NP) em um modelo murino com infecção prolongada de candidose bucal. NP de CUR foram sintetizadas utilizando o polímero poli-ácido láctico (PLA) e sulfato de dextrana (DEX). Brometo de cetiltrimetil-amônio foi também utilizado para NP catiônicas. Para caracterização dessas formulações, foram determinadas as propriedades físicoquímicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta), testes de eficiência de encapsulamento, espectro de absorção, fotoestabilidade e liberação. Um total de 140 camundongos fêmeas com 6 semanas de vida foram imunossuprimidos e inoculados com uma cepa padrão de *Candida albicans* (Ca) em uma concentração de 1×10^7 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) na região dorsal da língua. Para a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), uma das formulações sintetizadas ou CUR livre foi aplicada no dorso lingual dos animais que, após 20 min, foram irradiados com uma fonte de luz LED azul a $37,5 \text{ J/cm}^2$ (grupo F+L+). Animais adicionais foram tratados somente com uma das formulações ou CUR livre sem luz (F+L-), Nistatina 1 vez ao dia (NIS1x), Nistatina 4 vezes ao dia (NIS4x) ou não receberam nenhum tratamento (controle). Em todos os grupos, os procedimentos foram realizados em 5 dias consecutivos. Após a última aplicação do tratamento, coletas da língua dos animais foram plaqueadas em meio de cultura específico (CFU/mL). Os animais foram eutanasiados 24 h e 7 dias após o último dia de tratamento, as línguas foram removidas e submetidas às análises histológica e expressão de citoqueratinas (CK) 13 e 14 por ensaio imunohistoquímico (IHQ). Os dados [$\log_{10}(\text{CFU/mL})$] foram analisados por ANOVA/Welch e Games-Howell ($\alpha=5\%$). Após a síntese, as CUR-NP apresentaram propriedades nanométricas farmacotécnicas adequadas, com valores médios de tamanho, polidispersão e potencial zeta 225.38; 0.15 e -30.96 mV; 248.12; 0.21 e +35,84 mV respectivamente para as CUR-NP aniônica e catiônica. Foi observada uma eficiência de encapsulamento de 60.84% e 73.81% para as CUR-NP aniônicas e catiônicas. O espectro de absorção das CUR-NP foram semelhantes à CUR livre, com sinais mais elevados de absorbância. CUR livre apresentou uma menor fotodegradação após 20 min de iluminação ($43,2 \text{ J/cm}^2$). A liberação de CUR das NP aniônicas e catiônicas foi de 52% após 12 horas de estudo. No estudo *in vivo*, foi observado uma redução significativa de $1,19 \log_{10}$ para o grupo F+L+ com CUR livre ($p<0,001$), $1,39 \log_{10}$ para o grupo NIS4x ($p<0,001$) e uma maior redução de $2,59 \log_{10}$ para o grupo NIS1x ($p<0,001$), quando comparados com o grupo controle. aPDT mediada por CUR-NP aniônica não apresentou efeito antifúngico e a CUR-NP catiônica apresentou efeito antifúngico com e sem luz. Na análise histológica foi observada presença de Ca no epitélio de todos os animais inoculados, porém os animais tratados com nistatina e F+L+ com CUR livre apresentaram menor quantidade de Ca para ambos os períodos de eutanásia. Na análise IHQ foi observada uma intensa marcação para CK 13 e 14 em todos os animais inoculados com exceção dos animais tratados com F+L+ com CUR livre, que apresentaram marcações similares do animal saudável. O encapsulamento da CUR em NP melhorou a solubilidade em água e a estabilidade da CUR, porém a CUR livre mostrou um melhor efeito fotodinâmico do que as CUR-NP.

Palavras-chave: Nanopartículas. Queratinas. Camundongos. *Candida albicans*.

Sakima VT. Antifungal and epithelial cytokeratin evaluation after photodynamic therapy mediated by Curcumin nanoparticulated in murine model of oral candidosis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

The aims of this study were to synthesize and evaluate the antimicrobial photodynamic effects of curcumin (CUR) encapsulated in polymeric nanoparticles (NP) on a murine model with prolonged infection of oral candidosis. CUR-NP was synthesized using poly-lactic acid (PLA), and dextran sulfate (DEX). Cetyltrimethylammonium bromide was used for cationic NP. To characterize the formulations, the physicochemical properties (size, polydispersity and zeta potential) were determined and tests of encapsulation efficiency, absorption spectrum, photostability (photodegradation of CUR) and release were also performed. The effectiveness of CUR-NP-mediated aPDT was evaluated in a murine model of oral candidiasis. Female mice (N = 140) were immunosuppressed and inoculated with *C. albicans* (Ca) to induce oral candidosis. For aPDT, formulations or free CUR was applied on the dorsum of tongue and, after 20 min, illumination at 37.5 J/cm² was performed (F+L+ group). Additional animals were treated only with formulations or free CUR without light (F+L-), nystatin once a day (NYS1x), nystatin four times a day (NYS4x) or received no treatment (control). In each group, procedures were performed for 5 consecutive days. After the last treatment application, microbial samples were plated in specific agar media (CFU/mL). The animals were euthanatized 24 hours and 7 days after the treatments for histological evaluation and expression of cytokeratin (CK) 13 and 14 by immunohistochemistry (IHC). Data [log₁₀(CFU/mL)] were analyzed by ANOVA/Welch and Games-Howell ($\alpha = 5\%$). After synthesis CUR-NP had appropriate pharmacotechnical nanometric properties, mean values of size, polydispersity, and zeta potential were 225.38; 0.15 and -30.96 mV; 248.12; 0.21 and +35.84 mV, respectively for anionic and cationic CUR-NP. Encapsulation efficiency of 60.84% and 73.81% for anionic and cationic CUR-NP were observed. Peaks absorption for CUR-NP and CUR were close to UV-visible range, the absorption spectrum of CUR-NP were similar to free CUR, with higher absorbance signals. Free CUR showed a lower photodegradation after 20 min of illumination (43.2 J/cm²). The release of CUR from anionic and cationic NP was 52% after 12 hours of study. *In vivo* study, a significant mean reduction of 1.19 log₁₀ for the F+L+ group (p<0.001), 1.39 log₁₀ for the NIS4x group (p<0.001) and a greater reduction of 2.59 log₁₀ for the NIS1x group (p<0.001) was observed when compared with the control group. aPDT mediated by anionic CUR-NP had no antimicrobial effect, and cationic CUR-NP showed antimicrobial effect even in light absence. In histological analysis a few amount of Ca in the epithelium was observed for the nystatin and aPDT with free CUR groups compared with the control group. In IHC analysis, for both CK, animals submitted to aPDT with free CUR showed a less intense expression similar to the healthy animals compared with all other groups. The synthesized formulation improved the water solubility and stability of CUR, but free CUR showed a better photodynamic effect than CUR-NP.

Keywords: Nanoparticles. Keratins. Mice. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)	16
2.2 Candidose Oral.....	16
2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT).....	18
2.4 Curcumina	20
2.5 Sistemas Nanoestruturados	22
2.6 Curcumina Nanoparticulada	23
2.7 Citoqueratinas	27
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos	31
4.2 Síntese e Caracterização da CUR em Nanopartícula Polimérica.....	35
4.2.1 Fotossensibilizador e encapsulamento em nanopartículas.....	35
4.2.2 Caracterização das CUR-NP.....	35
4.2.3 Análise da morfologia das nanopartículas.....	36
4.2.4 Eficiência de encapsulamento	36
4.2.5 Espectro de absorção e estudo da fotoestabilidade dos FSs	36
4.2.6 Liberação de CUR das NP's.....	37
4.3 Avaliação dos Efeitos da aPDT em Modelo Murino de Candidose Bucal	37
4.3.1 Fonte de luz.....	37
4.3.2 Animais	38
4.3.3 Cultivo do micro-organismo	38
4.3.4 Indução de candidose oral nos camundongos.....	39
4.3.5 Terapia fotodinâmica (aPDT) e grupos de estudo	40
4.3.6 Eutnásia dos animais	42
4.3.7 Preparo das lâminas histológicas.....	42
4.3.8 Avaliação histológica por coloração ácido periódico-Schiff (PAS)	42
4.3.9 Avaliação de citoqueratinas 13 e 14 por ensaio imunohistoquímico	43
4.4 Análise estatística	44
5 RESULTADO.....	46
5.1Curcumina Nanoparticulada	46
5.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas.....	46
5.1.2Análise da morfologia das nanopartículas.....	47

5.1.3 Eficiência de encapsulamento (EE)	47
5.1.4 Espectro de absorção e estudo de fotoestabilidade dos FSs	48
5.1.5 Liberação de CUR das NP.....	50
5.2 Modelo Murino com Candidose Oral.....	50
5.2.1 Avaliação dos efeitos da aPDT em um modelo murino de candidose bucal.....	50
5.2.2 Análise histológica da língua dos animais.....	53
5.2.3 Avaliação de CKs 13 e 14 por ensaio Imunohistoquímico	55
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	68
APÊNDICES.....	69

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de micro-organismos altamente organizados que podem colonizar uma superfície biótica ou abiótica. Eles são envolvidos em uma matriz polimérica extracelular produzida pelo próprio biofilme, o qual favorece relações simbióticas e permite a sobrevivência em ambientes hostis³⁶. Sua formação se inicia com a aderência dos micro-organismos livres a uma superfície. Esses colonizadores primários facilitam a aderência de outras células por proporcionar diversos sítios de adesão e por iniciar a síntese da matriz que mantém o biofilme coeso. Iniciada a colonização, o biofilme se desenvolve por meio de divisão celular e recrutamento de células, que são capazes de se comunicar via “quorum sensing” (sistema de comunicação intercelular dependente da concentração intercelular, associada a regulação genética)³⁶. Em uma etapa seguinte, o biofilme já se apresenta maduro e estabelecido, alterando-se apenas em forma e tamanho. A fase final do desenvolvimento envolve a separação de células do biofilme e a dispersão no ambiente, a qual, para muitos micro-organismos patogênicos, desempenha papel crítico na sua transmissão, tanto de reservatórios ambientais para hospedeiros humanos, como entre hospedeiros, e na exacerbação e disseminação da infecção no mesmo hospedeiro⁴¹. As infecções microbianas de uma forma geral estão fortemente associadas a biofilmes, o que confere às células que os compõem interações benéficas mútuas, maior proteção contra as defesas do hospedeiro, além de propriedades fenotípicas distintas das células livres (planctônicas) e maior resistência aos agentes antimicrobianos^{8,13}.

A candidose bucal é a infecção fúngica de maior prevalência nos seres humanos, que possui como principal fator etiológico os fungos do gênero *Candida*. A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente² e de maior virulência⁸ que vive como comensal em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis⁶¹. No entanto, sob determinadas condições, esse micro-organismo atua como um patógeno oportunista, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções. O fungo *C. albicans* tem a capacidade de se desenvolver em diversas formas morfológicas, que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células filamentosas, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)⁶³. Este polimorfismo celular está relacionado à patogenicidade das células de *C. albicans*, pois, uma vez caracterizadas na forma filamentosa, as barreiras do epitélio protetoras do hospedeiro podem ser ultrapassadas, favorecendo o aparecimento das infecções⁶³.

Os fatores de risco para candidose bucal incluem o uso de próteses dentárias, antibióticos, medicamentos imunossupressores e também condições sistêmicas como diabetes, deficiências nutricionais e câncer^{61,62}. Devido a forte ligação da infecção fúngica com o estado imunológico do

paciente, a candidíase já foi considerada um indicador do desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) antes do surgimento dos antiretrovirais⁵⁵. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção pode se espalhar do local original e atingir a corrente sanguínea, promovendo uma infecção sistêmica conhecida como candidemia. Acima de 90% dos casos dessa infecção sistêmica são atribuídos às espécies de *Candida*, e o número de mortes como resultado da candidemia varia de 40% a quase 80% em pacientes imunossuprimidos^{18,20}.

Os agentes antifúngicos convencionais utilizados para a candidose local ou sistêmica mostraram algumas desvantagens, com o desenvolvimento de cepas resistentes⁶³, portanto, novas alternativas antimicrobianas têm sido pesquisadas. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos é a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{21,44,64}, que utiliza a associação de um agente fotossensibilizador (FS) a uma fonte de luz de comprimento de onda adequado. A interação entre o FS e a luz na presença do oxigênio resulta na produção de espécies reativas tóxicas, principalmente o oxigênio singlete e radicais livres que promovem dano e morte celular. Atualmente, o tratamento mediado pela PDT tem sido utilizado no tratamento de câncer como um método de inativação de células neoplásicas⁴⁴. Já a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) encontra-se ainda em fase experimental com poucos estudos clínicos⁵². No entanto, vários estudos *in vitro* demonstraram a eficácia da aPDT na inativação da *C. albicans*^{11,12,15,16,17,21,23,25,27,31,48,49}.

Diversos tipos de FS têm sido propostos em estudos laboratoriais, e compostos naturais como a curcumina (CUR) tem mostrado um grande potencial de aplicação para fotoinativação microbiana de biofilme de *C. albicans*^{4,23,26}. A CUR é um composto de baixo peso molecular isolado dos tubérculos da *Curcuma longa* e um dos componentes presente no açafrão. Tem sido demonstrado que, isoladamente, a CUR já apresenta efeito antifúngico contra *C. albicans*⁵⁰, e estudos recentes verificaram que esse efeito é potencializado quando a CUR é utilizada como FS associada à luz^{4,23,26}. No entanto, a CUR não é hidrossolúvel, apresenta biodisponibilidade limitada e instabilidade (alta susceptibilidade à degradação fotolítica e hidrolítica)³². Adicionalmente, para veiculação da CUR tem sido utilizado solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido (DMSO)^{4,23,26,57}, que apresentam toxicidade celular. Por isso, é importante a investigação de novos sistemas de veiculação, como micelas poliméricas, ciclodextrinas, lipossomos, nanopartículas e nanoemulsões, com o intuito de aumentar a solubilidade e diminuir a degradação de FSs hidrofóbicos¹.

Nanopartículas poliméricas são sistemas de liberação de fármacos muito estáveis e biocompatíveis, que incluem nanoesferas e nanocápsulas⁶⁸. Nanoesferas consistem de sistemas de matrizes em que o fármaco é disperso dentro do polímero em toda partícula, enquanto que

nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco é confinado a uma cavidade cercada por uma membrana polimérica simples⁶⁸. A maioria dos estudos que avaliam sistemas de liberação de fármacos são voltados para o tratamento de câncer^{47,54,65,67}, e alguns desses sistemas já foram caracterizados para CUR, mas a ação fotodinâmica antimicrobiana foi avaliada somente em culturas planctônicas de bactérias^{36,37}. Poucos estudos⁶⁷ analisaram a fotoinativação de biofilmes com FSs hidrofóbicos veiculados nesses sistemas de liberação de fármacos. Assim, verifica-se que essas nanoformulações, além de possibilitarem a estabilidade e a solubilização de FSs hidrofóbicos em soluções aquosas, apresentam um potencial fotodinâmico para aplicação antimicrobiana. Além disso, os efeitos fotodinâmicos da CUR em nanoformulações contra biofilmes de *C. albicans* ainda são poucos conhecidos.

A CUR, dentre suas diversas propriedades terapêuticas, tem sido utilizada também como um agente de cicatrização, promovendo a cicatrização através do aumento de tecido de granulação e melhora na biossíntese do fator de crescimento (TGF)- β 1 e das proteínas da matriz extracelular¹. A cicatrização tecidual é um processo complexo natural com quatro fases dinâmicas interligadas: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. Durante a primeira fase (homeostase) ocorre a formação do coágulo; na fase de inflamação, ocorre a migração de células do sangue para o local do tecido injuriado; na fase proliferativa ocorre a granulação, contração e reepitelização dos tecidos; e por último, remodelação, envolve a formação de tecido conjuntivo celular e o fortalecimento do epitélio recém-formado^{1,7}. Citoqueratinas (CKs) epiteliais são proteínas constituintes do citoesqueleto epitelial envolvido no processo de cicatrização tecidual⁷⁰ e está presente em toda a cavidade oral⁵⁶, além disso, seu nível específico de expressão é usado para diagnosticar patologias orais, como carcinomas⁵⁶. Enquanto a CK13 é distribuída em camadas suprabasais do epitélio estratificado, a CK14 é expressa em células basais não diferenciadas do epitélio escamoso estratificado^{37,38}. Ambas as CKs são expressas durante a morfogênese das células filiformes e circunvaladas de animais^{37,38}. Como a candidose oral é uma infecção superficial⁶¹ e a forma filamentar⁶³ de *C. albicans* é capaz de romper as barreiras epiteliais e invadir tecidos, essa invasão pode promover alterações da expressão de CKs epiteliais.

Os estudos investigados¹ revelaram que a CUR tem potencial antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, acelerando o processo de cicatrização. Porém, a CUR apresenta diversas limitações¹: devido sua baixa bioatividade, rápido metabolismo, baixa solubilidade e sensibilidade à luz. Portanto, para contornar essas limitações, novas fórmulações nanoparticuladas (NP) têm sido exploradas, como proposta inicialmente no projeto de pesquisa. Nesse contexto, algumas

pesquisas^{5,14,29,33,42,67} foram realizadas para o desenvolvimento mais eficiente de sistemas de liberação de drogas, com o intuito de melhorar a cicatrização.

Estudos com modelos animais permitem avaliar a eficácia e a segurança de novas modalidades terapêuticas para que essas possam ser testadas posteriormente com mais segurança em humanos. Com o modelo murino de candidose oral utilizado em estudos prévios^{10,23,51,66}, as lesões do dorso lingual são mantidas por até 7 dias e a eficácia do tratamento antifúngico é feita em 24 após administração. Por essa razão, num estudo prévio, foi desenvolvido um modelo animal de candidose oral em que a infecção induzida foi mantida por um período de tempo mais prolongado¹⁰. Nesse estudo, após 5 aplicações de aPDT mediada por Photodithazine e luz LED, foi verificada redução significativa de *C. albicans* da língua dos animais e completa remissão das lesões comparado com o grupo tratado com nistatina. Com esse modelo murino de candidose oral prolongado é possível avaliar a efetividade de aplicações sucessivas da aPDT, simulando o tratamento clínico para essa infecção^{52,53}, e analisar os parâmetros macroscópicos (regressão das lesões) e histopatológicos (cicatrização).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)

Salton et al.⁶⁰ (1951) avaliaram a toxicidade do CTAB contra culturas planctônicas de três bactérias distintas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. As bactérias foram tratadas com diferentes concentrações de CTAB, variando de 45 a 900 µg/mL. Após o tratamento, as amostras foram preparadas e metalizadas com ouro/paládio para serem observadas em microscopia eletrônica. Foi verificada a morte de 99% dos micro-organismos de *S. aureus* e *E. faecalis* quando tratados durante 30 minutos com CTAB a 900 µg/mL e 90 µg/mL, respectivamente. Uma concentração de 45µg/mL do CTAB durante 20 minutos foi capaz de eliminar 30% dos micro-organismos de *E. coli*. Foi observada a morte completa de *E. coli* quando utilizado o CTAB a uma concentração de 900 µg/mL durante 30 min. A membrana celular dos micro-organismos apresentaram danos devido a permeabilização do CTAB na membrana, ocasionando a autólise das bactérias.

2.2 Candidose Oral

Takakura et al.⁶⁶ (2003) desenvolveram um método para estabelecer um modelo de candidose oral em camundongos, com a formação de um biofilme de *C. albicans* estável na cavidade oral e sinais no tecido característicos de candidose oral. Para isso, os camundongos foram previamente imunossuprimidos com prednisolona (100mg/kg) e receberam cloridrato de tetraciclina 0,83mg/ml durante todo o experimento. Eles foram infectados por um inóculo de *Candida albicans* (isolado clínico) com 10⁶ células viáveis na região dorsal da língua. Esse procedimento foi realizado através de um swab embebido no incóculo e esfregado na região dorsal da língua. Previamente à inoculação, os animais foram sedados com cloridrato de clorpromazina (10mg/kg) para mantê-los em estado sedativo durante 3 horas após a infecção. Durante o terceiro dia até o sétimo dia após a inoculação foi recuperado da língua de cada animal 10⁵ -10⁶ unidades formadoras de colônias de *C. albicans*. Macroscopicamente foi observada lesão por placas brancas em quase toda região dorsal da língua. Microscópicamente foi observada inúmeras hifas de *C. albicans* na camada da superfície do epitélio no dorso da língua. Os autores ressaltaram que para uma efetiva colonização das leveduras na superfície da língua, é necessário que os animais fiquem sedados por pelo menos 3 horas após a inoculação para que, a *C. albicans* em sua forma de maior virulência (hifas), consiga invadir e se instalar no epitélio. Além disso, a associação da imunossupressão e antibioticoterapia (tetraciclina) contribuiu para um maior número de micro-organismos instalados no epitélio.

Ruiz-Herrera⁵⁹ (2005) revisou diversos estudos em relação à organização estrutural molecular de *C. albicans* e sua patogenicidade. *C. albicans* é um dos mais importantes fungos patogênicos oportunistas. O enfraquecimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro e a capacidade do micro-organismo se adaptar nos tecidos do hospedeiro, transformam o fungo inofensivo em um patógeno agressivo. A doença, a candidíase, varia de infecções superficiais leves a infecções profundas que colocam a vida do paciente em risco. No estabelecimento do processo patogênico, a parede celular de *C. albicans* desempenha um papel importante. Essa apresenta características próprias e distintas das demais espécies do gênero, e é constituída principalmente de carboidratos, sendo três os constituintes básicos que representam a maior parte desses polissacarídeos: os polímeros ramificados de glicose denominados β -glucanas; polímeros não ramificados de N-acetilglicosamina (quitina) e polímeros de manose ligados covalentemente às proteínas de superfície. Os polímeros de glucana e quitina contêm várias proteínas de adesão e são responsáveis pela resistência mecânica e a morfologia celular, se apresentam mais próximos da membrana citoplasmática, limitando a permeabilidade e as propriedades hidrofóbicas da superfície celular. Os polímeros de quitina podem formar emaranhadas estruturas por meio de ligações de hidrogênio contribuindo com aumento da insolubilidade. Os polímeros de manose fazem o intermédio da aderência entre o fungo e a célula hospedeira, através da formação de uma densa rede de fibrilas associadas às mannoproteínas presentes na camada mais externa da parede. A hidrofobicidade da parede celular fúngica é uma característica importante por aumentar a habilidade de interação do micro-organismo com o hospedeiro. Alterações nos constituintes da parede celular podem levar a uma transição superficial da parede de hidrofílico para hidrofóbico ou vice-versa, resultando em uma mudança na quantidade de energia liberada durante a interação com a célula do hospedeiro.

Segundo Al-Fattani e Douglas³ (2006), a composição da matriz do biofilme varia de acordo com a natureza dos organismos presentes. Os polímeros matriciais bacterianos são principalmente exopolissacarídeos, e muitos são carregados negativamente devido à presença de grupos carboxilo, sulfato ou fosfato. Para avaliar a resistência da matriz extracelular, esses autores formaram biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis* sobre uma superfície de policloreto de vinila (PVC) sob condições estáticas e sob fluxo contínuo, utilizando um *dispositivo modificado de Robbins*. A condição contínua de fluxo desse dispositivo tem como objetivo simular as condições fisiológicas do organismo. Posteriormente, os biofilmes foram associados a cepas de *Staphylococcus epidermidis* e tratados com anfotericina B ou fluconazol. Os biofilmes foram visualizados por meio de microscopia eletrônica de varredura, utilizando a técnica de “secagem a frio” com o intuito de

preservar a matriz extracelular do biofilme, reduzindo sua desidratação. Ambos os biofilmes produziram maior quantidade de matriz de polissacarídeo extracelular sob condições de fluxo contínuo do que aqueles cultivados em condições estáticas, além de serem significativamente mais resistentes à anfotericina B. Também foi verificado que o biofilme de *C. albicans* associado à cepa de *S. epidermidis* cultivado sob fluxo contínuo foi completamente resistente aos fármacos, uma vez que essas concentrações eram 5 e 30 vezes maior que a mínima concentração inibitória encontrada em culturas planctônicas desses fungos. Esses resultados sugerem que a formação do biofilme submetido a condições de fluxo contínuo produz substancialmente mais material de matriz do que aqueles incubados estaticamente e a composição do material da matriz é um fator determinante na resistência aos medicamentos dos biofilmes.

2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Segundo Soukos e Goodson⁶⁴ (2011), o efeito da aPDT ocorre basicamente pela ação de três componentes distintos: luz visível (em um comprimento de onda adequado) que não cause danos celular; FS; formas tóxicas de oxigênio formadas a partir da interação da luz visível com o FS. Após a aplicação do FS nas células de interesse, é irradiado uma fonte de luz em um comprimento adequado à absorbância do FS, fazendo com que as moléculas do FS sejam excitadas pela absorção de fótons. Assim, essas moléculas excitadas transferem a energia capturada em forma de fótons para moléculas de oxigênio, originando espécies reativas como: oxigênio singleto e radicais livres, ambos apresentando propriedades citotóxicas para as células. Dessa forma, podem ocorrer duas reações distintas ocasionados desse processo: reação tipo I e reação tipo II. Na primeira, ocorre a transferência de elétron entre o fotosensibilizador no estado tripleto excitado, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados: superóxidos, hidroxilas e radicais derivados de lipídios. Já na reação tipo II, ocorre a transferência de energia de moléculas do FS excitadas ao seu triplo estado diretamente às moléculas de oxigênio. Formando o produto: Oxigênio singleto, que é altamente reativo e considerado a espécie de oxigênio de maior citotoxicidade obtida na aPDT. A propriedade antimicrobiana conferida à aPDT é baseada na formação do oxigênio singleto obtido na reação do tipo II e sua consequente interação com a membrana citoplasmática e DNA dos micro-organismos. Dessa forma, a formação dos tipos tóxicos de oxigênio pode ocorrer extra ou intra-celular, dependendo da molécula que receberá o fóton do estado excitado do FS. Devido à promissora ação anitimicrobiana da aPDT, essa técnica tem sido proposta na odontologia como tratamento alternativo ao uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos tradicionalmente usados no controle de infecções orais como: cárie dental, doenças periodontais e peri-implantes, infecção endodôntica e candidose oral.

Mima et al.⁵³ (2012) avaliaram clinicamente a eficácia da aPDT mediado por derivado de hematoporfirina (Photogem®) no tratamento de estomatite protética comparando com o antifúngico nistatina. Pacientes diagnosticados com candidose oral foram submetidos a 6 sessões de aPDT, sendo 3 sessões por semana durante 15 dias. Photogem preparado a 500mg/L foi aplicado no palato e nas próteses dos pacientes por um tempo de pré-irradiação de 30 minutos. Em seguida o palato recebeu uma dose de luz LED azul com um comprimento de onda de 455nm durante 20 minutos, equivalente a 122J/cm². A prótese também recebeu o FS com um tempo de pré-irradiação de 30 minutos e uma dose de luz equivalente a 35,7J/cm². Para efeito de comparação, outros pacientes receberam nistatina em suspensão oral prescrita 4 vezes ao dia durante 15 dias. Todos os pacientes foram instruídos a remover a prótese enquanto dormiam. Para avaliação da efetividade do tratamento, foram realizados coletas microbiológicas e quantificadas em UFC, além da tomada de fotografias intra-orais, antes e depois do tratamento. Foi observada uma redução significativa na viabilidade de *C. albicans* após o termino do tratamento e uma redução dos sinais de inflamação do palato nos pacientes tratados com aPDT e Nistatina.

Dovigo et al.²⁴ (2013) avaliaram a fotoinativação de *Candida albicans* em um modelo murino de candidíase oral, utilizando CUR em sua forma livre como FS. Quarenta camundongos foram imunossuprimidos e inoculados por via oral com *C. albicans*. Após cinco dias, foi aplicado CUR em concentrações de 20, 40 e 80 µM em toda região dorsal da língua com um tempo de pré-irradiação de 20 minutos protegido da luz. Em seguida, foram iluminados com luz LED azul (470nm) em uma potência de 37,5 J/cm². Os animais do grupo controle não receberam nenhum tratamento e os animais de controle negativo não foram inoculados com *C. albicans* (animal saudável). Para verificar o efeito da luz, animais adicionais foram tratados somente com luz sem FS. O número de células de levedura foi recuperado da língua dos animais no final de cada tratamento, o qual foi determinado os valores de UFC/ml. Foi também realizada avaliação histológica da presença de levedura e reação inflamatória. Foi observado que todos os animais tratados com CUR e luz apresentaram uma redução significativa na viabilidade de *C. albicans* e uma menor presença de leveduras na camada epitelial em relação ao grupo controle. Porém, os animais tratados com CUR a uma concentração de 80 µM apresentou uma total redução (4logs) de micro-organismos e a ausência de micro-organismos na camada epitelial. Os autores concluíram que a PDT mediada por CUR provou ser eficaz para a inativação in vivo de *C. albicans* sem prejudicar o tecido dos camundongos.

Carmello et al.¹⁰ (2016) avaliaram a eficácia da aPDT em um modelo murino de candidíase oral mediada pela Photodithazine (PDZ). Este modelo de candidíase oral foi adaptado para permitir

o monitoramento da infecção e o estabelecimento do tratamento aPDT (período de infecção prolongado). Camundongos fêmeas de seis semanas de idade foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* na região dorsal da língua. O tratamento com aPDT mediado pela PDZ (100mg/L) com uma potência de 37 J/cm² em um comprimento de onda de 660nm foi realizado durante 5 dias consecutivos com uma aplicação diária. Grupos adicionais tratados com nistatina foram incluídos para efeito de comparação. Após tratamento, foi realizada a avaliação macroscópica das lesões orais e a recuperação das colônias de *C. albicans*, as quais foram quantificadas e o número de UFC/mL foi determinado. Os animais foram sacrificados 24 horas e 7 dias após o tratamento e as línguas foram removidas cirurgicamente para análise histológica e análise da expressão de citocinas inflamatórias (Interleucina 1, IL-1; Fator de necrose tumoral alfa, TNF- α ; interleucina 6, IL-6) por reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa (RT-qPCR). A aPDT mediada por PDZ foi tão efetiva quanto a nistatina na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs₁₀, respectivamente, 24 h e 7 dias após o tratamento. Macroscopicamente, foi observado que os animais submetidos a aPDT mostraram remissão completa de lesões orais, enquanto animais tratados com nistatina apresentaram remissão parcial de lesões orais em ambos os períodos avaliados. A avaliação histológica revelou infiltrado inflamatório leve nos grupos tratados com aPDT e nistatina em ambos os períodos avaliados. O aPDT induziu a expressão de TNF- α quando comparado com o controle, tanto para 24 h e 7 dias após o tratamento. Os autores concluíram que o modelo murino desenvolvido, foi capaz de imitar a infecção e aPDT mediada por PDZ foi eficaz para tratar camundongos com candidíase oral.

2.4 Curcumina

Dovigo et al.²⁴ (2011) avaliaram os efeitos da aPDT mediada pela CUR em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Para isso, CUR foi preparado em 10% de dimetilsufóxido (DMSO) e diluído em solução salina. Foi observado que a capacidade da CUR de absorver luz foi diminuindo progressivamente à medida que o tempo de iluminação foi aumentando, indicando uma indução de *photobleaching* (destruição fotoquímica de um fluoróforo). Após uma dose de luz de 0,4 J/cm², cerca de 70% da CUR havia sido fotodegradada. Em relação aos experimentos da viabilidade de *C. albicans*, foi observada a erradicação de culturas planctônicas fungicas utilizando CUR a 20 μ M a uma potência de luz de 37,5 J/cm². Em biofilmes de *C. albicans*, CUR a 40 μ M apresentou uma diminuição de 87,22% na viabilidade de *C. albicans* utilizando uma potência de 5,28 J/cm². Os autores também avaliaram o efeito da aPDT mediada pela CUR (concentrações de 0,5; 1; 5; 10 e

20 μ M) em culturas de macrófagos pelo ensaio de MTT. Os autores observaram uma diminuição da atividade metabólica dessas células de 7,13%, 17,22%, 82,51%, 73,26% e 86,39% respectivamente. Foi sugerido que, embora a CUR preparada apresente toxicidade celular nas células de macrófago, essa toxicidade é maior para a levedura do que para as células de defesa.

Gong et al.³⁰ (2013) encapsularam a CUR em micelas poliméricas em um sistema hidrogel termosensível com o objetivo do gel se aderir a uma ferida e liberar CUR gradativamente em um tempo prolongado após uma única aplicação. CUR e o copolímero poli(etilenoglicol)-poli(ϵ -caprolactana) foram dissolvidos em álcool desidratado sob agitação magnética. Para se obter CUR carregadas em micelas, essa solução foi submetida à evaporação e dissolvida em solução salina. Foi observado que em 7 dias após a aplicação tópica de CUR (hidrogel) em feridas incisionais na região dorsal de ratos, os animais apresentaram maior teor de colágeno, melhor granulação, maior maturação da ferida, diminuição dramática das enzimas superóxido dismutase e ligeiro aumento das enzimas catalase nos tecidos (efeito antioxidante). O exame histopatológico também implicou que a CUR em hidrogel melhorou o reparo da ferida cutânea. Já em 14 dias foi observada uma maior redução da ferida acompanhada de maior contração e re-epitelização do tecido, além do aumento de colágeno, maior tecido de granulação e maturação tecidual. As feridas apresentaram maior ressecamento e ausência de fluidos patológicos, inflamação e infecção.

Kant et al.⁴⁰ (2014) avaliaram os efeitos anti-inflamatório e antioxidante da CUR em forma de gel em feridas de ratos diabéticos. A diabetes foi induzida nos animais através de uma injeção subcutânea de *streptozotocin*. O índice de glicose no sangue foi avaliado antes e depois da indução. Então as feridas foram realizadas no dorso dos animais e foi aplicado diariamente CUR em gel plurônico F-127 durante 19 dias. Os autores observaram uma redução da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), aumento dos níveis de interleucina 10 (IL-10) e enzimas antioxidantes em diferentes dias de cicatrização do tecido injuriado, esses resultados foram obtidos através de estudos por RT-PCR e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Na análise histopatológica foi observado que os animais tratados com a CUR apresentaram maior proliferação de fibroblastos, maior deposição de colágeno e menor quantidade de células inflamatórias. Esses dados revelaram que o potencial anti-inflamatório e antioxidante da CUR resultou em uma cicatrização das feridas mais aceleradas.

Akbik et al.¹ (2014) revisaram diversos estudos, demonstrando que a CUR apresenta efeitos positivos em três estágios do processo de cicatrização tecidual (inflamação, proliferação e remodelação). O efeito da CUR no estágio de inflamação é inibir a atividade do fator nuclear kappa beta [NF-(κ) β], reduzir a produção de citocinas, como o TNF- α e IL-1, e consequentemente, reduzir

o processo inflamatório. Já no estágio de proliferação, a CUR auxilia nas funções dos processos de reepitelização: migração dos fibroblastos, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. E no último estágio, remodelação, a CUR aumenta a produção de fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e, conseqüentemente, a proliferação dos fibroblastos. Os estudos investigados revelaram que a CUR tem potencial antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, acelerando o processo de cicatrização. Porém, a CUR em sua forma livre é limitada, devido sua baixa bioatividade, rápido metabolismo, baixa solubilidade e sensibilidade à luz. Para contornar essas limitações, os autores sugeriram que novas fórmulações NP devem ser estudadas e exploradas.

Krauz et al.⁴⁵ (2015) sintetizaram uma formulação de CUR-NP pelo método sol-gel. Para isso, ortosilicato de tetrametileno (TMOS) foi hidrolisado pela adição de HCl, seguido de sonicação em banho de gelo. A mistura foi refrigerada até a formar uma fase única. A CUR foi diluída em metanol e combinada com quitosano (4,4%, 5 mg/ml), polietilenoglicol 400 e TMOS-HCl (8,8%) para induzir a polimerização, em seguida a amostra foi liofilizado. As NP's de controle foram sintetizadas de forma idêntica, sem adição de CUR. Cepa de isolados clínicos de MRSA e foi descongelada, cultivada e inoculada em feridas por queimadura no dorso dos animais em uma concentração de 5×10^8 UFC. Foi aplicado diariamente 50uL de CUR-NP nas feridas durante 7 dias. Durante o terceiro e o sétimo dia após a inoculação, os micro-organismos da ferida dos animais foram coletados e quantificados. Foi observada uma inibição do crescimento de bactérias presente no dorso dos animais em relação ao grupo controle. Também foi observado que a CUR-NP acelerou o fechamento das feridas, aumento do tecido de granulação e uma reepitelização mais precoce em relação ao grupo controle.

2.5 Sistemas Nanoestruturados

Gaumet et al.²⁸. (2007) destacaram os principais parâmetros das nanopartículas como tamanho e polidispersão das nanoformulações. Para avaliar as dimensões de uma nanopartícula em suspensão, os autores relataram o método por dispersão da luz ou *Dynamic Light scattering* (DLS). Esse método normalmente é o mais utilizado para avaliar o tamanho e polidispersão (homogeneidade) das nanopartículas. Esse método consiste em avaliar o movimento *Browniano* das partículas em suspensão a partir das flutuações de intensidade da luz espalhada incidida sobre uma partícula. Esse movimento possibilita a estimativa do tamanho das partículas. Partículas pequenas apresentam movimento rápido e partículas grandes apresentam movimento lento. Um cálculo é realizado a partir desse movimento associado à refração da luz no meio, estimando os valores das propriedades nanométricas. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela toda vez

que a viscosidade da formulação, o pH, a sedimentação de nanopartículas podem ocasionar modificações nesses resultados. A polidispersão é um parâmetro que também deve ser rigorosamente avaliado, pois esse valor pode variar em relação ao tamanho da partícula, índice de refração do solvente, ângulo de medição e a variância de distribuição. O índice de polidispersão pode ser considerado “bom” (distribuição homogênea das partículas) quando este valor se apresenta em uma escala entre 0-1. Além do método DLS, o tamanho das nanopartículas pode ser avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), que por sua vez, pode também avaliar a morfologia estrutural das partículas.

Segundo Kumari et al⁴⁶. (2010), as nanopartículas biodegradáveis têm sido utilizadas com frequência como veículos de fármacos devido à sua biodisponibilidade, encapsulamento, liberação controlada e baixa toxicidade. Esses autores revisaram os métodos de síntese de formulações NP e quatro polímeros muito utilizados para veiculação de fármacos, entre eles, são: poli-ácido lático (co-glicólico) (PLGA), poli-ácido lático (PLA), Poli-caprolactona (PCL) e quitosana. Nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por várias técnicas, de acordo com a aplicação e tipo do fármaco a ser encapsulado. A encapsulação pode ocorrer de duas maneiras: o fármaco é incorporado ao polímero durante a preparação das partículas ou o fármaco é adsorvido ao polímero após a preparação da partícula, ou seja, as partículas são imersas em uma solução contendo o fármaco. A composição do fármaco, estabilidade, solubilidade, velocidade de liberação, alvo terapêutico, são alguns dos fatores a ser analisada previamente a escolha do método de síntese e da modificação estrutural da formulação ao desenvolvimento de NP, dentre os métodos mais utilizados são: emulsificação-difusão, evaporação do solvente-emulsão, deposição interfacial e nanoprecipitação. O PLA é produzido a partir de recursos renováveis, são biodegradáveis, e não apresentam toxicidade e se metabolizam em unidades de ácido lático, o qual serve como intermediário do metabolismo dos carboidratos. O PLGA apresenta propriedades hidrofóbicas e são hidroliticamente instável, sua degradação se dá por erosão matricial em meio aquoso, se metabolizando em unidades de ácido lático e ácido glicólico.

2.6 Curcumina Nanoparticulada

Yallapu et al.⁷¹ (2010) encapsularam CUR em nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Para isso, 90 mg de PLGA foi dissolvido em 10 mL de acetona e uma solução de 10 mg de CUR dissolvida em 500 µL de acetona foram combinadas. Em seguida, foi adicionado uma fase aquosa composta por álcool poli-vinílico (PVA) em diferentes concentrações que

variaram entre 0,25% a 1% w/v e poli (L-lisina), durante 10 min sob agitação magnética a 800 rpm. Após 24 horas sob agitação magnética, o solvente foi evaporado. As propriedades farmacotécnicas da formulação foram analisadas pelo método de dispersão de luz (DLS). Os autores observaram uma diminuição do tamanho das partículas com o aumento de concentração de PVA, com tamanhos variando entre 560,4, 256,8, 246,8, 205, 95,6 e 76,2 nm para concentrações de 0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1%, respectivamente. As formulações apresentam valores de potencial zeta entre +0,06 e -0,06. A eficiência de encapsulamento variou entre 49,56 e 89,53%. Na visualização por microscopia eletrônica de varredura, foi observado nanopartículas com tamanhos de aproximadamente 45 nm e uma morfologia esférica. Após 25 dias, os autores observaram uma liberação entre por meio da técnica de diálise. A formulação de CUR encapsulado em nanopartículas também mostrou um maior efeito inibitório sobre o crescimento de células de tumorigênicas comparado com a CUR livre.

Ghosh et al.²⁹ (2012) encapsularam CUR em nanopartículas poliméricas (PLGA) pelo método de emulsão-difusão-evaporação. Para isso, 100mg de PLGA e 10mg de CUR foi dissolvido em 6 mL de acetato de etilo à temperatura ambiente e emulsionado com uma fase aquosa contendo brometo de Didodecyldimetilamônio durante 3 horas. Em seguida, foi realizada a homogeneização a 15.000 rpm durante 5 minutos. O solvente orgânico foi removido por agitação constante em um “banho-maria” a 40°C. A eficiência de encapsulamento da CUR foi de 78%. Foi observado por microscopia de força atômica um tamanho médio de 15 nm das CUR-NP. No estudo com modelo animal, foi desenvolvido um tumor no fígado dos animais com doses de Dietilnitrosamina para avaliar o efeito da CUR-NP. Nos animais tratados com CUR-NP, foi observada uma prevenção do peso relativo do fígado (a indução do tumor faz aumentar esse peso), um efeito antioxidante pela produção significativa de espécies reativas de oxigênio singlete em mitocôndrias (responsáveis pelo estresse oxidativo das células) e a diminuição de células cancerígenas presente no fígado.

Cherreddy et al.¹⁴ (2013) encapsularam CUR em nanopartículas poliméricas (PLGA) pelo método de emulsão e evaporação do solvente. Álcool polivinílico (PVA) foi utilizado como agente estabilizante. As propriedades farmacotécnicas da formulação foram analisadas pelo método de dispersão de luz (DLS). O tamanho médio foi de $176,5 \pm 7,0$ nm, a polidispersão média de $0,105 \pm 0,025$, potencial zeta obtido foi $-23,2 \pm 3,8$ mV e eficiência de encapsulamento de $89,2 \pm 2,5\%$. A liberação da CUR das NP foi avaliada pelo método de diálise. Foi observada a liberação de $40,5 \pm 4,5\%$ de CUR nas primeiras 24 horas. O estudo de citotoxicidade das CUR-NP, CUR, PLGA e PLGA-NP em células de queratinócitos foram medidos por ensaios de metabolismo celular e de *High-densityLipoprotein* (HDL), em concentrações de 30 a 100 µg dessas formulações. Não houve diferença estatística citotóxica na atividade metabólica dos queratinócitos. No estudo em animais,

as formulações foram aplicadas intradermicamente ao redor de feridas na região dorsal dos animais. Os resultados obtidos através de estudos histológicos e RT-PCR mostraram a CUR-NP acelerou o processo de cicatrização do tecido injuriado, promovendo uma reepitelização do tecido mais eficiente e diminuindo a atividade enzimática das mieloperoxidasas (atividade anti-oxidante) e a inibição da expressão/nível dos mediadores inflamatórios em comparação com os outros grupos (PLGA, CUR e NP de PLGA). Esses autores demonstraram que CUR-NP utilizando PLGA foi capaz de controlar e manter a liberação de CUR e ácido láctico, diminuindo a resposta inflamatória, acelerando a reepitelização e formação de tecido de granulação, além de acelerar significativamente a cicatrização da ferida quando aplicada topicamente.

Khalil et al.⁴² (2013) encapsularam CUR em nanopartículas poliméricas pelo método de solvente-emulsão. CUR e PLGA foram dissolvidos em acetato de etila e cloreto de metila contendo ou não polietileno glicol (PEG), formando uma fase orgânica. Em seguida, uma fase aquosa composta por álcool poli-vinílico foi adicionado à essa fase orgânica e emulsionado por sonicação durante 5 minutos em temperatura ambiente. O solvente foi eliminado por evaporação a vácuo. As propriedades farmacotécnicas da formulação foram analisadas pelo método de dispersão de luz (DLS) e a eficiência de encapsulamento foi avaliada por dialise. Os autores observaram que as nanopartículas de CUR-NP de PLGA apresentaram tamanho de 161,93 nm, polidispersão de 0,042 e 77,07% de eficiência de encapsulamento. As nanopartículas de CUR-NP de PLGA-PEG apresentaram tamanho de 152,37 nm, 0,077 de polidispersão e 73,22 % de eficiência de encapsulamento. A liberação da CUR das NP foi feita utilizando o sistema *High performance Liquid Chromatography* (HPLC), com o qual foi possível observar liberação de 21% de CUR após 24 h e um total de 56,9% após 9 dias para as CUR-NP de PLGA-PEG. Já a CUR-NP de PLGA apresentou uma liberação de 5,8% em 24 horas e de apenas 37% em onze dias. As nanopartículas foram administradas por via oral a uma única dose em ratos e os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados e comparados com a CUR livre. Foram observadas que ambas as formulações de CUR-NP foram capazes de sustentar a biodisponibilidade de CUR ao longo do tempo comparadas com a CUR livre, porém CUR-NP de PLGA-PEG apresentou uma maior eficiência.

Baltazar et al.⁵ (2015) sintetizaram uma formulação de CUR-NP pelo método sol-gel. Para isso, ortosilicato de tetrametileno (TMOS) foi hidrolisado pela adição de HCl, seguido de sonicação em banho de gelo. A mistura foi refrigerada até a formar uma fase única. A CUR foi diluída em metanol e combinada com quitosano (4,4%, 5 mg/ml), polietilenoglicol 400 e TMOS-HCl (8,8%) para induzir a polimerização, em seguida a amostra foi liofilizada. As NP's de controle foram sintetizadas de forma idêntica, sem adição de CUR. CUR livre foi preparado em dimetilsulfóxido

(DMSO) em concentração inferior a 1%, sem que o solvente não apresentasse na atividade fungicida. A atividade fotodinâmica das CUR-NP e CUR em DMSO foi avaliada sobre o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* em um modelo planctônico. Foram utilizadas concentrações de 1,0 e 10 µg/ml de CUR e CUR-NP associadas à luz azul em um comprimento de onda de 420 nm. Os autores observaram uma diminuição significativa da viabilidade fúngica em comparação com o grupo controle não tratado para ambas as formulações. A terapia fotodinâmica foi comparada com terapia convencional (antifúngico itraconazol). Quando utilizado somente a luz azul, sem a adição de FS, foi observada uma atividade fungicida, porém não foi capaz de inibir completamente o crescimento dos micro-organismos. Foi observado uma melhoria da fotoinativação fungica com a utilização da CUR-NP em comparação com a CUR livre. O encapsulamento de CUR em NP protegeu a CUR da degradação hidrolítica e enzimática, aumentando sua biodisponibilidade devido ao aumento da solubilidade em água. Os autores observaram que tanto a CUR e CUR-NP associada a luz, foi capaz de inativar os micro-organismos de *Trichophyton rubrum*.

Hazzah et al.³³ (2015) sintetizaram diferentes formulações de CUR em nanopartículas sólidas de lipídeo (NSL) pelo método de homogeneização quente utilizando Gelucire 50/13 e poloxamer 407 como agentes estabilizantes, e Gelucire 39/01, Gelucire 50/13, Compritol e Precirol como lipídeos. Foram realizados diferentes testes para caracterizar CUR-NSL pelas suas propriedades farmacotécnicas. Os autores observaram pelo método DLS (Zetasizer NS) que o tamanho médio da CUR-NSL variou entre 184 a 950 nm, o índice de polidispersão entre 0,441 e 1,00 e potencial zeta entre -17 e -15. Para determinar a eficiência de encapsulamento (EE) as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 22000 g, durante 1 hora a 4°C e foi observado uma EE de 78 a 98%. Foi verificada uma liberação de CUR entre 41,5 e 53% pelo método de diálise após 5 horas de imersão. No estudo *ex vivo*, CUR-NSL apresentou uma boa capacidade adesiva à mucosa oral de frango. O objetivo dessa adesão é facilitar aplicabilidade clínica dessa formulação. Além disso, foi avaliada a mínima concentração inibitória (MIC) da CUR-NSL sobre: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e os valores desses testes foram 1,5, 3, 0,375, 6, 3, e 0,375 mg/mL, respectivamente.

Trigo-Gutierrez et al.⁶⁷ (2016), CUR foi encapsulada em nanopartículas (NP) utilizando o polímero poli-ácido láctico (PLA) resultando em duas formulações, uma catiônica e outra aniônica, ambas as formulações apresentaram propriedades farmacotécnicas adequadas. No entanto, o efeito fotodinâmico dessas formulações foi avaliado em três micro-organismos: *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Os autores observaram que a

CUR-NP associada à luz azul, em sua forma aniônica, promoveu a diminuição da viabilidade dos três micro-organismos em cultura planctônica. Porém, essa mesma formulação não teve efeito em biofilme misto formado por essas três espécies. Por outro lado, a formulação de CUR-NP catiônica na presença e na ausência de luz, reduziu a viabilidade dos três micro-organismos em cultura planctônica e também em biofilme. Segundo os autores, esse efeito microbicida pode ser atribuído à incorporação de CTAB utilizado como surfactante para tornar a formulação catiônica.

2.7 Citoqueratinas

dos Santos et al.²² (2003) avaliaram a expressão das CK em queilite actínica(QA). 34 blocos parafinizados de pacientes diagnosticados com QA foram classificados de acordo com o grau da intensidade de displasia. Por isso, foi realizado cortes em laminas histológicas silanizadas e submetido a teste imunohistoquímico (IHQ) pelo método estreptavidina-biotina dos anticorpos primários para CK 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 em diferentes diluições. Todos os casos apresentaram de alteração basófila dentro do tecido conjuntivo. Foi observada a presença de infiltrado inflamatório leve em aproximadamente metade dos casos, e na outra metade foi moderado a intenso. De acordo com os parâmetros para classificação de intensidade da displasia, oito casos foram classificados como displasias leves, 18 como moderadas e oito como graves. A CK14 foi expressa em todas as camadas epiteliais em 31 casos, em dois casos sua expressão estava nas camadas basal e intermediária, e um caso foi negativo. A CK13 foi expressa em 26 casos e foi negativa em oito casos, os quais foram expressos pela CK16. Também foi observado expressão das CK16 nas camadas intermediárias espinhosas de outros oito casos. As CK's remanescentes testados foram todos negativos. A expressão de CK da QA foi diferente na mucosa oral normal e não apresentou relação ao grau de displasia.

Jacques et al.³⁹ (2009) estudaram o perfil de expressão das CK 10, 13, 14 e 19 nas lesões orais do líquen plano, além de investigar possíveis associações entre a expressão dessas CK e dados clínico-epidemiológicos ou alterações displásicas. Foram utilizados anticorpos monoclonais para as CK supracitadas, em 26 amostras de líquen plano oral por IHQ pelo método da estreptavidina-biotina nos cortes de tecido emblocados em parafina. A análise das amostras revelou expressão suprabasal da CK 10 em 16 das 17 amostras, expressão suprabasal da CK13 em 18 das 23 amostras, sendo que 16 delas apresentaram retardo na marcação, expressão basal e suprabasal da CK14 em todas as amostras, e expressão basal da CK19 em 4 das 21 amostras. Os autores concluíram uma expressão alterada das CK 10, 13, e 14 nas lesões de líquen plano oral, quando comparada com uma mucosa oral normal.

Iwasaki et al.³⁷(2011) avaliaram a CK13 e CK14 através de ensaio IHQ de fluorescência, análises de imagens de contraste de interferência diferencial e microscopia confocal de varredura, para examinar a localização da CK13 e CK14 no epitélio lingual de ratos durante a morfogênese pré-natal e pós-natal das papilas circunvaladas. Foram utilizados ratos férteis fêmeas enjaulados com ratos machos reprodutores, o dia em que foi observada a gestação das fêmeas, foi considerado o primeiro dia de gestação (E1). O período de gestação de ratos é de aproximadamente 21 dias. Os fetos foram removidos nos dias E15, E17 e E19 das fêmeas. As línguas também foram removidas após o nascimento dos ratos logo após o nascimento (P0), no dia 7 pós-natal (P7) e no dia 14 pós-natal (P14). Não foi detectada imuno-expressão específica para CK13 e CK14 no epitélio lingual dos fetos no durante a morfogênese pré-natal. Foi detectada a imunoexpressão específica de CK14 pela primeira vez na camada basal do epitélio das papilas circunvaladas no primeiro dia pós-natal 0 (P0) e a para CK13 foi detectada em sétimo dia pós natal (P07). A morfogênese das papilas circunvaladas progrediu significativamente de P0 a P14, e a imunoexpressão específica para CK13 e CK14 foi claramente reconhecida após P7. Os padrões de imunoexpressão para CK13 e CK14 diferiram durante o desenvolvimento das papilas circunvaladas: a marcação específica de CK13 foi geralmente evidente em células da camada intermediária do epitélio, enquanto a marcação específica de CK14 foi detectada em células basais e camadas supra basais.

Rivarola de Gutierrez et al.⁵⁸ (2014) avaliaram a expressão de CK1, CK13 e CK14 em trinta e três pacientes com líquen plano oral (OLP). Essas lesões foram diagnosticadas e estavam localizadas na superfície dorsal da língua, na mucosa queratinizada do palato e na mucosa bucal não queratinizada. As amostras das biopsias foram fixadas e parafinizadas para serem avaliadas histologicamente. O processo imunohistoquímico foi realizado pelo método estreptavidina-biotina, e foram utilizados anticorpos primários monoclonais de camundongos para CK1, 13 e 14. A avaliação da imunocoloração foi classificada como positiva ou negativa nas camadas basal e supra basal. Os autores observaram que a CK1 estava presente em 64% das amostras na camada suprabasal e em 16% na camada basal. Também, foi observada a expressão de CK13 na camada basal em 42% das amostras e essa expressão estava associada com o alto grau de vascularização na camada basal e a presença de exocitose linfocitária. Por fim, as CK14 foi expressa em 97% das amostras na camada basal e em 94% nos estratos supra basais.

Rao et al.⁵⁶ 2014 revisaram os princípios básicos sobre as CK orais com ênfase nos distúrbios e implicações orais genéticos e adquiridos. As queratinas são subdivididas em dois grupos distintos com base na sua estrutura, função e regulação. As queratinas ricas em cisteínas são de natureza “*hard*” e são encontradas nos apêndices epidérmicos (cabelo e unhas), enquanto que as

queratinas citoplasmáticas classificadas como “*soft*”, são feixes compactados filamentosas envolvidas em células epiteliais, ou seja, proteínas estruturais básicas das células epiteliais. Elas são abundantes na cavidade oral, epitélio das glândulas salivares e também são expressos durante a odontogênese. Além disso, as CK são biomarcadores sensíveis e específicos para a avaliação da diferenciação nas células epiteliais para diagnósticos patológicos, demonstrando um padrão de expressão específico de um sítio variando com seu nível de diferenciação. Esta propriedade evoluiu como um potencial marcador epitelial em biologia celular, embriologia e patologia. As CK são os marcadores “padrão-ouro” no diagnóstico IHQ, com a finalidade de classificar o tipo ou subtipo de um carcinoma e detectar uma metástase. CK se constituem em um importante componente do citoesqueleto, sendo responsáveis pela função de manutenção estrutural da célula e do tecido, proteção contra traumas mecânicos e intercomunicação entre células adjacentes. Também, as CK estão associadas com o processo mitótico das atividades celulares epiteliais, regulando a síntese de proteínas e o crescimento celular participando diretamente da cicatrização tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a efetividade da aPDT mediada pela CUR-NP em um modelo murino de candidose bucal. A avaliação da CUR-NP foi comparada à CUR livre. Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Sintetizar e caracterizar CUR em nanopartículas poliméricas (CUR-NP);
2. Avaliação antifúngica da aPDT mediada pela CUR e CUR-NP, comparando com o tratamento com Nistatina, em um modelo murino com candidose oral (infecção prolongada);
3. Avaliação do efeito da CUR, CUR-NP e Nistatina associado ou não a luz na expressão de CKs do epitélio de camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

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

Ácido Cítrico Monohidratado P.A. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Ácido clorídrico 37% P.A. – A.C.S. – ISSO (Panreac);

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

Água mili-Q

Albumina de Soro Bovino iofilizado $\geq 98\%$ GE (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);

Alça de inoculação 10 μ L, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);

Álcool Anidro 99,3° (Ciclo farma, Serrana, SP, Brasil);

Anticorpo primário monoclonal mouse anti-CK13, Modelo ab16112 (ABCAM®, Cambridge, Reino Unido);

Anticorpo primário monoclonal mouse anti-CK14, Modelo ab7800 (ABCAM®, Cambridge, Reino Unido);

Azida Sódica (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Cabo de bisturi reto (TRINKS Instrumentos odontológicos, São Paulo, SP, Brasil);

Cassete Histológico (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil);

Citrato de Sódio Tribásico Dihidratado P.A. A.C.S. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Cloreto de Cálcio Dihidratado P.A. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

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

Cloridrato de Xilazina, (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, SP, Brasil);

Cloridrato de clorpromazina, medicamento para uso veterinário (Farmácia santa Paula Araraquara, SP, Brasil);

Cloridrato de Ketamina, (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, SP, Brasil);

Cloridrato de Tetraciclina, 1g, medicamento para uso veterinário (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil);

Cotonetes (Cotton-baby, Higie-Plus Cottonbaby Ind. Com. Ltda., São José, SC, Brasil);

CTAB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA Número (ATCC number): 90028;

Curcumina $\geq 65\%$ de pureza (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Dextrana (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

DMSO (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil)

Sílica Gel Branca (4-8mm) P.A. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

E.D.T.A. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Fosfato de Potássio dihidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Kit Mouse specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC KIT (modelo ab64259, ABCAM®, Cambridge, Reino Unido);

Lâmina para microscopia 26x76mm (PERFECTA Lab, São Paulo, SP, Brasil);

Lâmina silanizada ImmunoSilde para microscopia 25x75mm marca (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil);

Lâminas para bisturi (FREEBACK);

Lamínulas para microscopia, 24X60mm (PERFECTA);

Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);

Micropipeta de 100-1000 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

Micropipeta de 20-200 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);

Nistatina 100.000UI Suspensão Oral, marca Micostatin® (Indústria farmacêutica EMS, São Bernardo do Campo, SP, Brasil);

Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm)(BOECO);

Parafina histológica (56°-58°C) (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Paraformaldeído em pó 95% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Permout (Fisher Chemical™ Permout™, Pittsburgh, PA, EUA);

Peróxido de Hidrogênio P.A. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Pinça clínica (DUFLEX Equipamentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);

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 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);

Prednisolona 40mg, marca DEPO-MEDROL (Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brasil);

Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA);

Seringa para insulina, marca BD Ultra-Fine II (CBS MEDICO Cientifica S/A, São Paulo, SP, Brasil);

Tesoura cirúrgica de ponta fina reta (CBS MEDICO Cientifica S/A, São Paulo, SP, Brasil);

TRIS (Hidroximetil) Aminometano P.A. – A.C.S. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

TRITON™ X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);

Tubos tipo Falcon de 10 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

Xilol PA 1000mL (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Agitador de tubos, Modelo: AP 56 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil)

Agitador magnético, Modelo: 78HW-1 (Andrade's Comércio e materiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil);

Aparelho LED (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA)

Aparelho Sputter Coater (SCD 050 BAL-TEC, Scotia, NY, EUA);

Autoclave vertical, Modelo: AV 60 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil)

Balança de precisão, fabricada por GEHAKA – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil Modelo: BG 400 No 016450

Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);

Dessecador com Tampa e Luva, Modelo: 76335L (Labor Quimi Vidrolabor®, Poá, SP, Brasil)

Espectrofotômetro, Modelo: Biospectro SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);

Espectrofotômetro UV-Vis (SQ 4802 UV-Visible Double Beam Spectrophotometer UNICO, United Products & Instruments Inc.);

Estufa bacteriológica, Modelo: MA0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);

Freezer -80°C (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA);

Incubadora de bancada shaker, Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);

Micro-ondas, Modelo: JetDeFrost 27L (Brastemp, São Paulo, SP, Brasil.);

Microscópio eletrônico de Varredura com Emissão de Campo (JEOL modelo 7500F);

Microscópio óptico, Modelo: BX51 (Olympus, Tóquio, Japão);

Micrótomo, Modelo RM2125 (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suíça);

Zetasier Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK);

4.2 Síntese e Caracterização da CUR em Nanopartícula Polimérica

4.2.1 Fotossensibilizador e encapsulamento em nanopartículas

CUR livre, CUR-NP aniônico e catiônico foram utilizados como FS no presente estudo. CUR livre foi preparada a partir de uma solução estoque de CUR (260 mM) dissolvida em DMSO (10%) e diluída em água estéril^{4,23,26}. O encapsulamento da CUR em nanopartículas poliméricas foi realizado pelo método de nanoprecipitação^{46,67}. Esse processo de síntese divide-se em duas fases, aquosa e orgânica. Primeiramente, uma solução estoque de CUR (0,4%) foi preparada em acetona contendo o polímero poli-ácido lático (PLA) a 0,5% (fase orgânica). Em seguida, foi adicionado uma fase aquosa contendo sulfato de dextrana 1% (DEX) pelo método de gotejamento sobre essa fase orgânica em agitação magnética lenta (90 – 100 rpm) em temperatura ambiente (25°C). Após esse procedimento, essa solução permaneceu em agitação magnética na mesma velocidade descrita anteriormente por 10 minutos. Essa solução foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente e protegida da luz para evaporação do solvente e estabilização do sistema. Esse procedimento resultou em uma formulação aniônica (carga superficial negativa). Para a síntese da formulação catiônica⁷², foi adicionada uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 2% e NaCl 1,76% preparado em água ultra-pura estéril. NP's vazias (controle) iônica e catiônica foram sintetizadas de forma idêntica, sem adição de CUR.

Este processo foi submetido a uma patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI (número de processo BR 10 2016 015631 9).

4.2.2 Caracterização das CUR-NP

As propriedades manométricas de caracterização das formulações de CUR-NP e NP aniônica e catiônica foram avaliadas pelo método *Dynamic Light Scattering* (DLS)⁶⁷. Essa técnica é geralmente utilizada para classificar o tipo de uma nanopartícula de acordo com suas propriedades manométricas, como, tamanho, índice de polidispersão (homogeneidade das partículas) e potencial zeta (valor em módulo da carga superficial). Esse método consiste em avaliar o movimento browniano das partículas em suspensão a partir das flutuações de intensidade da luz espalhada incidida sobre uma partícula. Após o encapsulamento da CUR em NP, as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:100 para serem lidas no aparelho Zetasizer Nano ZS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

4.2.3 Análise da morfologia das nanopartículas

Para realizar a análise morfológica, solução de NP-CUR e NP aniônico e catiônico foram preparadas em água ultra-pura estéril (1:200), gotejadas sobre um extrato de níquel e secadas em um dessecador a vácuo com esferas de sílica durante 48 horas protegido da luz²⁸. Em seguida, as amostras foram posicionadas em *stubs* condutores para o recobrimento por carbono⁶⁷ (metalização) no aparelho Sputter Coater (SCD 050 BAL-TEC). A morfologia das partículas foi analisada em microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG, Jeol, JSM 7500 F) do Instituto de Química da UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil. O tamanho das nanopartículas foi mensurado pelo software ImageJ (v1,51j8 Wayne Rasband – National Institutes of health, USA).

4.2.4 Eficiência de encapsulamento

Para avaliar a eficiência de encapsulamento (EE)⁶⁷, as amostras de CUR-NP aniônica e catiônica foram diluídas em uma concentração de 52 µM e lidas em espectrofotômetro UV-visível (FS_{total}). Em seguida, 5 mL de cada amostra foi centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a porção não sedimentada (nanopartículas) foi ressuspensa em 5mL de água ultra-pura e uma nova leitura foi realizada em espectrofotômetro (FS_{ressuspensa}). A EE foi calculada a partir do valor máximo de absorbância de cada amostra antes e depois de serem centrifugados pela seguinte formula:

$$EE (\%) = (FS_{ressuspensa} \times 100) / FS_{total}$$

4.2.5 Espectro de absorção e estudo da fotoestabilidade dos FSs

Foi realizada uma leitura de varredura entre 200-800 nm pelo espectrofotômetro UV/visível dos FS em uma concentração de 80 µM. A absorbância de cada amostra de CUR-NP foi comparada com a da CUR em DMSO (10%) em água destilada estéril. Para avaliar a fotoestabilidade e a fotodegradação, as amostras foram expostas a diferentes intervalos de iluminação (≈455 nm) de um dispositivo de diodos emissores de luz (LED azul) de 36 mW/cm². O espectro de absorção de cada amostra foi monitorado antes (0 min) e após diferentes doses de iluminação (1, 2,5, 5, 10 e 20 minutos, 2,16; 5,4; 10,8; 21,6; 43,2 J/cm² respectivamente). Foi utilizado NP para zerar o "blank" do espectrofotômetro correspondente às soluções de CUR-NP com o intuito de anular a hipótese de absorção da solução de excipientes (PLA e DEX).

4.2.6 Liberação de CUR das NP's

O teste de liberação foi realizado seguindo a metodologia proposta por Krausz et al.⁴⁵ com algumas modificações. Amostras de CUR-NP aniônica e catiônica foram diluídas em PBS em uma concentração de 130 μM e incubadas a 37°C numa velocidade de 100 rpm durante 14 horas. Em intervalos de 2 horas, uma alíquota de cada amostra foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 min para separar as nanopartículas da solução. O sobrenadante foi descartado, a porção sedimentada foi diluída em acetona para solubilizar a CUR não liberada, então, uma leitura da CUR solubilizada foi realizada em espectrofotômetro UV-visível. Para determinar a absorbância da CUR não liberada, foi dividido o valor de absorbância obtido em cada intervalo de tempo pela absorbância da CUR-NP encapsulada estimada como máxima determinada no estudo de Eficiência de Encapsulamento.

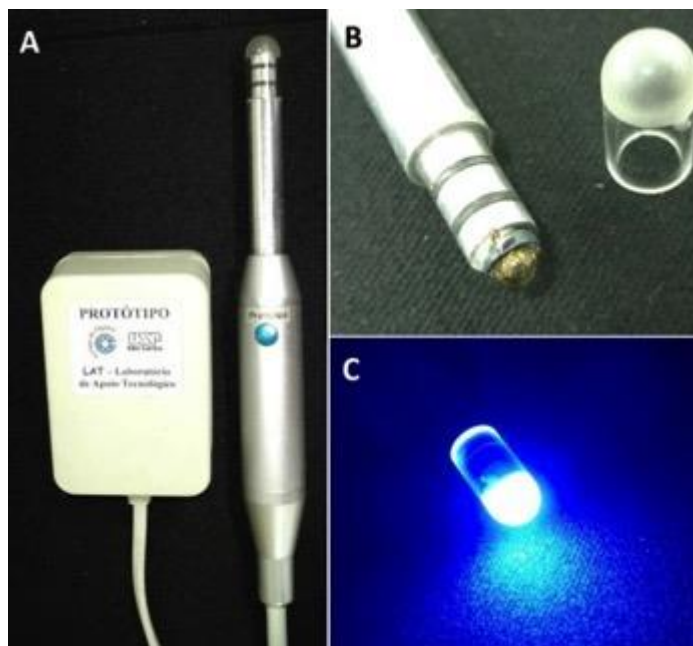
4.3 Avaliação dos Efeitos da aPDT em Modelo Murino de Candidose Bucal

A efetividade da aPDT mediada pela CUR livre e CUR-NP foi avaliada em um modelo animal de candidose bucal com o intuito de se estabelecer um protocolo de tratamento para candidose bucal em uma aplicação mais próxima à condição clínica.

4.3.1 Fonte de luz

Para esse estudo, foi utilizado um dispositivo na forma de caneta com um LED azul (455 nm) em sua extremidade, elaborado pelo Instituto de Física de São Carlos - USP, com intensidade de iluminação média de 150 mW/cm^2 (Figura 1). A ponta de emissão de luz do aparelho apresenta 5 mm de diâmetro com uma potência nominal de 75 mW e 660 mA de alimentação.

Figura 1 - A: Aparelho de luz LED elaborado pelo Instituto de Física São Carlos – USP. B: LED do aparelho de luz com diâmetro de 5mm. Fonte: C: Luz (azul) emitida pelo aparelho.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.2 Animais

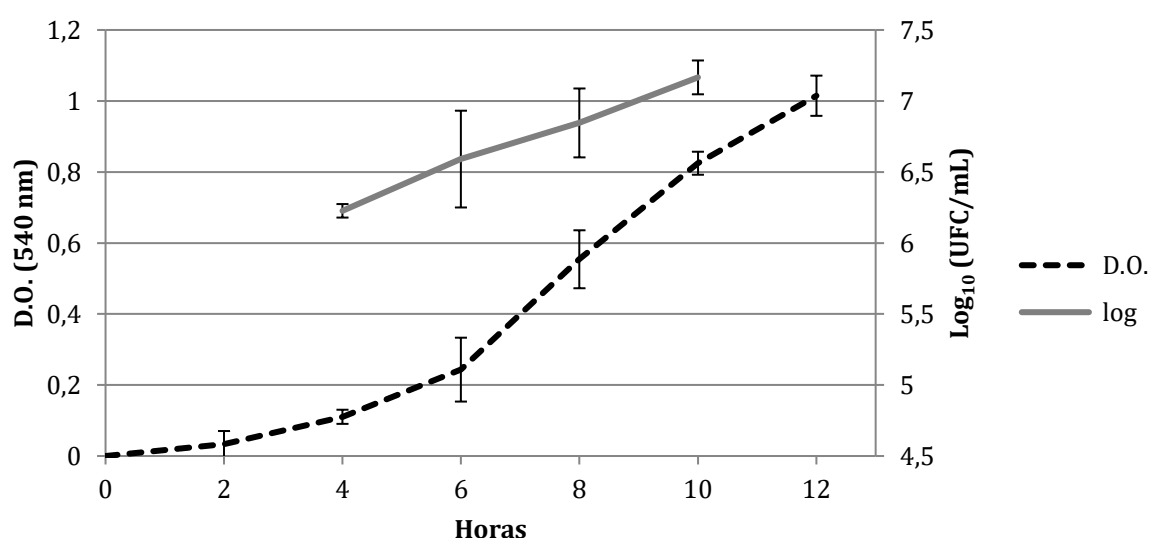
Este estudo foi submetido e autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo 19/2015, ANEXO A). Foram utilizados 140 camundongos fêmeas com aproximadamente 6 semanas de vida, que foram provenientes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, porém foram alojados no biotério para camundongos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, e alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.3.3 Cultivo do micro-organismo

Cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) foram utilizadas para a inoculação e indução de candidose oral nos animais. Previamente aos experimentos, a cepa foi descongelada e semeada individualmente por meio da técnica de esgotamento em meio de cultura sólido Sabouraud Dextrose Ágar com 5 mg/mL de cloranfenicol (SDA), o qual foi incubado a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas. Após esse período, com uma alça estéril foi coletado de 5 a 7 colônias, essas colônias foram transportados para um tubo contendo 10mL de meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) e incubados em estufa a 37°C em *overnight*, resultando em um pré-inóculo. Para formar o inóculo,

500 µL desse pré-inóculo foi diluído em outro tubo contendo 9,5mL de YNB (1:20) e novamente foi incubado em estufa a 37°C durante 8 horas para o crescimento dos micro-organismos até a fase *mid-log* da curva de crescimento (Figura 2, protocolo estabelecido pelo laboratório de microbiologia). Simultaneamente, foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm antes e após as 8 horas de incubação, no qual foram obtidos dois valores de densidade ótica (DO_{inicial} e DO_{final}). O valor inicial foi subtraído do valor final, resultando em um valor médio de DO correspondente a um valor médio de UFC/mL. A suspensão do inóculo foi padronizada em um valor médio de DO de 0,6 (1×10^7 UFC/mL) para serem utilizados nas etapas de inoculação nos animais.

Figura 2 - Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 90028.



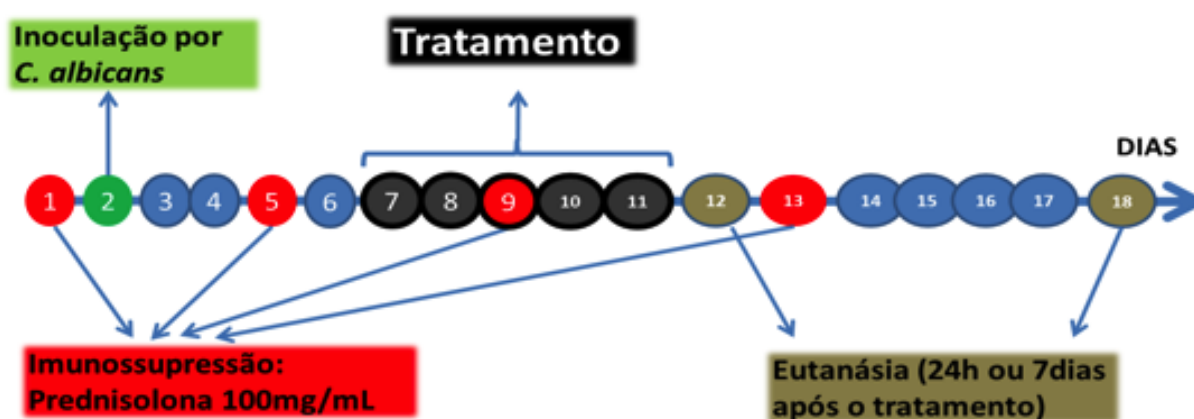
Fonte: Arquivo do laboratório de microbiologia aplicada, 4º andar, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, autoria de Juliana Cabrini Carmello, UNESP.

4.3.4 Indução de candidose oral nos camundongos

Para indução de candidose oral, foi utilizada a metodologia proposta por Takakura et al.⁶⁶ com algumas modificações com intuito de prolongar o tempo de infecção e possibilitar a aplicação de terapias sucessivas de acordo com Carmello et al.¹⁰ Os animais foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona na dose de 100 mg/kg de massa corporal (Figura 3), nos dias 1, 5, 9 e 13 do experimento (Figura 4A). Tetraciclina 0,83 mg/mL foi fornecida aos animais na água de beber durante todo o período experimental, para prevenir infecções bacterianas e contribuir para infecção fúngica⁶⁶. No dia 2 (Figura 3), os animais foram sedados por uma injeção intramuscular de 50 µL de cloridrato de clorpromazina 2 mg/mL em cada fêmur e inoculados com a suspensão de *C.*

albicans no dia 2 do experimento^{52,66}. Para isso, 15 minutos após a injeção, a língua de cada animal foi delicadamente exposta com uma pinça clínica, mini-swabs estéreis foram embebidos na solução de inóculo de *C. albicans* (descrito anteriormente) e esfregados sobre o dorso da língua dos animais por 30 segundos. Para a colonização de *C. albicans* na cavidade bucal foi necessário manter a sedação dos animais por um período de 2-3 horas realizada com a aplicação de cloridrato de clorpromazina conforme descrito. Esse período é considerado de extrema importância para que os fungos gerem tubos germinativos, transformando-se em pseudohifas e hifas (forma morfológica de maior virulência), permitindo assim a invasão tecidual⁶⁶.

Figura 3 - Representação diária de todo processo experimental com os animais.



Fonte: Elaboração própria.

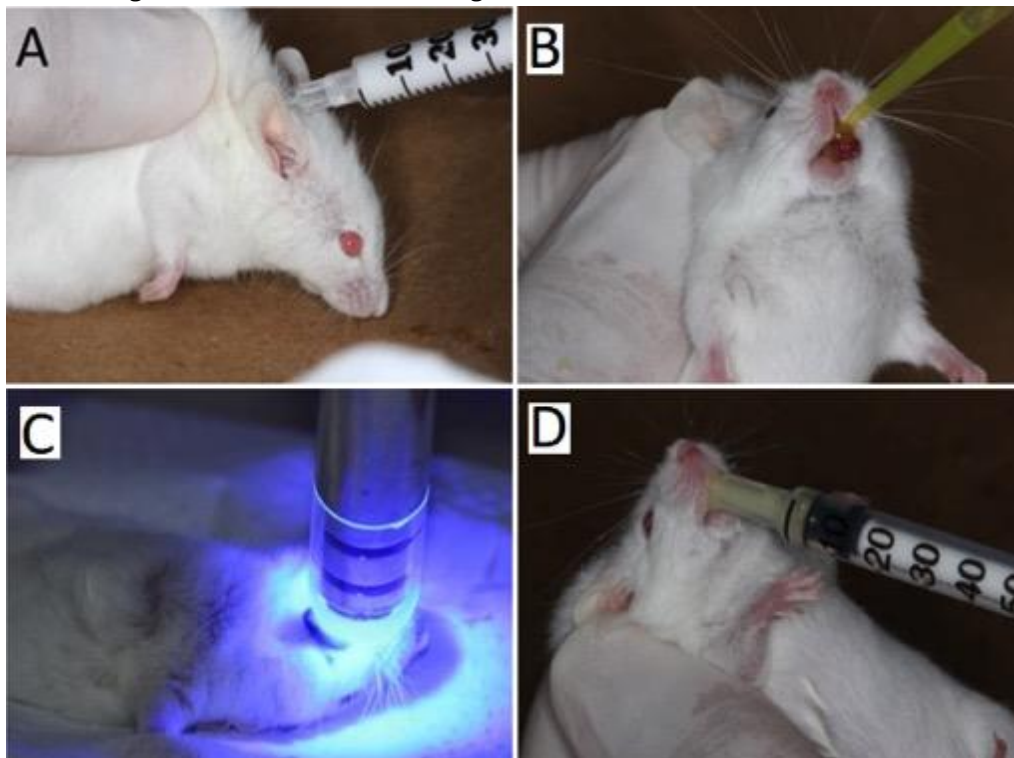
4.3.5 Terapia fotodinâmica (aPDT) e grupos de estudo

Do dia 7 ao dia 11 do experimento (Figura 3), num total de 5 dias, os animais foram submetidos diariamente aos seguintes grupos de estudo:

- ✓ Grupo aPDT (F+L+, 3 grupos): cada FS (CUR livre ou CUR-NP aniônica ou catiônica) foi avaliado na concentração de 260 μM . Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de quetamina a 100 mg/kg de massa corporal e xilazina 10 mg/kg de massa corporal e receberam aplicação tópica de 50 μL do FS durante 20 minutos na região dorsal da língua (Figura 4B). Após esse período, a língua dos camundongos foi iluminada pela luz LED a 37,5 J/cm² (7 minutos) (Figura 4C);
- ✓ Grupo F+L- (3 grupos): para se verificar um possível efeito tóxico do FS aplicado (CUR livre ou CUR-NP aniônica ou catiônica), animais adicionais foram tratados somente por um dos FS durante os tempos de incubação e iluminação;
- ✓ Grupo Nistatina (NIS 1x): para efeito de comparação da eficácia antifúngica, esse grupo foi tratado com 50 μL de nistatina tópica 100000 UI/mL, uma vez ao dia, sob anestesia geral;

- ✓ Grupo Nistatina (NIS 4x): também para efeito de comparação da eficácia antifúngica, esse outro grupo foi tratado com 50µL de nistatina tópica 100000 UI/mL (Figura 4D) quatro vezes ao (08:00h,12:00h,16:00h e 20:00h) dia sem anestesia geral (protocolo recomendado clinicamente);
- ✓ Grupo controle não tratado (CN, Controle negativo): cada animal recebeu apenas PBS pelos mesmos tempos de incubação e iluminação;
- ✓ Grupo controle negativo (CN): os animais não foram inoculados com o fungo e nem receberam tratamento.

Figura 4 - A: Animal imobilizado e aplicação do imunossupressor (via subcutâneo). B: Aplicação de CUR livre na língua dos animal sob anestesia geral. C: Animal anestesiado e submetido a aPDT. D: Aplicação de Nistatina na língua do animal sem anestesia geal.



Fonte: Elaboração própria.

Após a aplicação dos tratamentos por 5 dias consecutivos, foi realizada recuperação do micro-organismo da língua dos animais (Dia 11). Para isso, mini-swabs estéreis foram esfregados com movimentos circulares durante 1 minuto na língua de cada animal e armazenados em *eppendorfs* contendo 1 mL de solução salina 0,9%, os quais foram submetidos a diluições seriadas decimais, cujas alíquotas foram plaqueadas em duplicatas em placas de SDA e incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as colônias de *C. albicans* foram contadas para determinação dos valores de UFC/mL.

4.3.6 Eutanásia dos animais

Os camundongos foram sacrificados 24 horas (dia 12) ou 7 dias (dia 18) após a aplicação dos tratamentos propostos por uma dose letal de quetamina (0,2 mL) intramuscular no fêmur. A língua de cada animal foi removida, armazenada em *cassets* e fixado em solução de paraformoldeído a 4% para análise histológica e ensaio imunohistoquímico (IHQ).

4.3.7 Preparo das lâminas histológicas

Após fixação em paraformoldeído 4% durante 48 horas, as amostras foram lavadas⁶ em água corrente durante 4 horas para remoção do excesso de paraformoldeído. Após essa lavagem as amostras foram armazenadas em álcool 70% durante 24 horas. Então, foram realizadas duas lavagens de 1 hora em álcool 80% e 90%, e uma última lavagem com álcool absoluto por 4 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em álcool-xilol (50%) e, posteriormente, 3 horas no xilol. Após esse procedimento de lavagem, as amostras foram embebidas em parafina duas vezes por 1 hora, e em seguida foram embebidas novamente em parafina em *overnight*. No dia seguinte, foram realizadas mais duas lavagens em parafina por 1 hora novamente, e então foram incluídas transversalmente com a região de interesse voltadas para base do bloco (região que foram realizados os cortes iniciais) até o tempo de solidificação da parafina para realização dos cortes no micrótomo. Para a confecção das lâminas, foram realizados 3 cortes de 5 µm por lâmina, e 5 lâminas por amostra (2 lâminas normais para coloração por ácido periódico-Schiff, e 3 lâminas silanizadas para ensaio IHQ).

4.3.8 Avaliação histológica por coloração ácido periódico-Schiff (PAS)

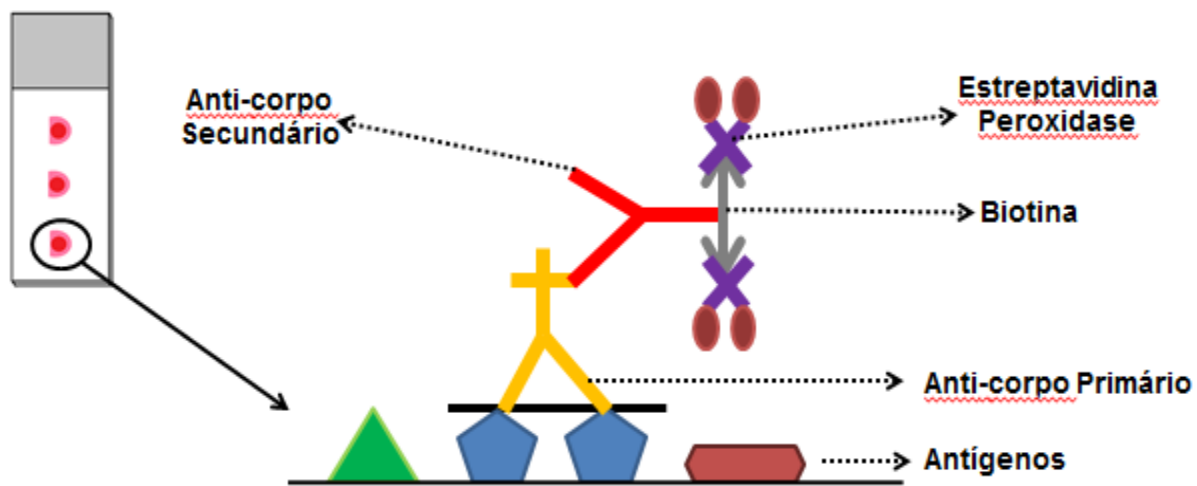
As lâminas foram desparafinizadas em banhos de 10 minutos de xilol absoluto, álcool-xilol (50%), álcool absoluto, 90%, 70%, 50% até água destilada. Em seguida as lâminas foram lavadas com ácido periódico 1% por 15 minutos, e em seguida, em água destilada por 3 minutos. Posteriormente, foram coradas no Reativo de Schiff por 45 minutos. Então, foi realizado um banho de 2 minutos em água sulfurosa e lavadas em água corrente por 25 minutos. Posteriormente, foram contra-coradas em solução de hematoxilina de Carazzi por 2 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente em água corrente por 5 minutos. Para finalizar, elas foram desidratadas em álcool 70%, 90%, absoluto e diafanizadas em álcool-xilol e xilol. Então, as lâminas foram montadas com Permount (Fisher Chemical™ Permount™) para serem visualizadas em microscópio óptico (BX-51, Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão).

4.3.9 Avaliação de citoqueratinas 13 e 14 por ensaio imunohistoquímico

Para avaliação da expressão das citoqueratinas (CK) 13 e 14 foi realizado o ensaio IHQ pelo método de avidina-biotina (Figura 5), que por sua vez se baseiam em quatro⁶ princípios:

- ❖ A extraordinária afinidade existente entre a avidina e a biotina que se ligam formando um complexo praticamente indissociável;
- ❖ A possibilidade existente de ligação entre a biotina e outras moléculas, como enzimas e anticorpos (anticorpos biotinilados);
- ❖ Possibilidade de se marcar a avidina com uma variedade de substâncias como enzimas, metais pesados ou fluorocromos;
- ❖ Possibilidade de utilização da avidina como ponte entre duas moléculas biotiniladas (por exemplo: um anticorpo e uma enzima).

Figura 5 - Esquema representativo da reação imunohistoquímico pelo método avidina-biotina.



Fonte: Elaboração própria.

Para isso, lâminas histológicas silanizadas (a silanização é um tratamento na superfície da lâmina a base de silano com o objetivo de melhorar a adesão entre a lâmina e o tecido, evitando o descolamento do mesmo durante o longo processo metodológico) com o corte das línguas dos animais foram desparafinizadas, como descrito anteriormente, porém em tempos maiores (30 minutos). A recuperação antigênica foi realizado por calor em micro-ondas em uma temperatura média de 97°C em solução de citrato de sódio 0,001M (para CK 14) ou TRIS-EDTA pH=9 (para CK 13). Esse processo é importante para quebrar as ligações cruzadas de formalina formadas no processo de fixação e expor os sítios dos antígenos para que os anticorpos primários possam se ligar a eles.

Em seguida as amostras foram lavadas e submetidas à inativação da peroxidase endógena com H_2O_2 4% por 10 minutos. Esse processo foi realizado pois, durante a etapa de coloração, o cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (cromógeno associado a peróxido de hidrogênio, DAB; ab64259, ABCAM®) reage com a peroxidase associada à estreptavidina, emitindo coloração. As células possuem a enzima peroxidase; portanto, se essa enzima não for bloqueada, haverá reação cruzada quando se aplicar o DAB com a peroxidase endógena celular, ao invés da reação antígeno-anticorpo, havendo, assim, um resultado falso positivo. Assim, depois da recuperação antigênica, aplica-se hidróxido de hidrogênio nas amostras, de modo que a peroxidase endógena seja inativada.

Após essa lavagem, as amostras foram incubadas em tampão de soro albumina/azida /triton a 4°C *overnight* com o anticorpo primário monoclonal mouse anti-CK 13 (ab16112, ABCAM®); e anticorpo primário monoclonal mouse anti-CK 14 (ab7800, ABCAM®), em diferentes concentrações para cada corte histológico (1:200 ; 1:400 ; 1:800). Na presença do antígeno de interesse, há a ligação antígeno/anticorpo. Em uma lâmina, foi realizado um controle da reação, no qual foi aplicado o soro sem o anticorpo primário. No dia seguinte, as amostras foram lavadas em solução de TRIS e incubadas com os anticorpos secundários biotinilados Goat Anti-Mouse IgG H&L HRP/DAB (ab64259, ABCAM®) para CK 13 e 14 por 20 minutos, reagindo e se ligando com o complexo antígeno-anticorpo primário. Após a incubação das amostras com os anticorpos secundários, foi aplicada a solução de estreptoavidina peroxidase (ab64259, ABCAM®) por 20 minutos, formando um complexo protéico que se liga fortemente às moléculas de biotina associadas ao anticorpo secundário. Assim, o cromógeno DAB (ab64259, ABCAM®) foi aplicado, reagindo com a peroxidase associada à estreptavidina, produzindo coloração marrom. Como é acrescentado um grande complexo formado por anticorpo secundário e várias estreptavidinas-peroxidases sobre um antígeno específico, há uma grande amplificação da marcação, facilitando a interpretação da imuno-expressão. Então as amostras foram contra coradas com hematoxilina de Carazzi, desidratadas em baterias de água, álcool e xilol, e montadas com Permount (Fisher Chemical™ Permount™). As imagens foram visualizadas em microscópio óptico (BX-51, Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão).

4.4 Análise Estatística

Em cada grupo e em cada período de sacrifício, foram avaliados 12 animais conforme estudo anterior¹⁰, exceto no grupo controle negativo em que se avaliou somente 3 animais. Em razão da menor efetividade da CUR-NP aniônica e ausência de efeito fotodinâmico antimicrobiano da CUR-NP catiônica comparadas com a CUR livre, os grupos de animais que receberam essas

formulações (F+L+ e F+L-) tiveram um menor número de camundongos avaliados por razões éticas (Quadro 1).

Os dados foram tabulados e os valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ foram submetidos à análise estatística inferencial. Uma vez que, os dados apresentaram distribuição normal (teste de normalidade de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$), mas a homogeneidade de variância não foi atendida (teste de Lévene, $p < 0,001$), os dados foram submetidos ao teste de ANOVA a um fator com correção de Welch e pós-teste de Games-Howell. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

Nas imagens histológicas e por IHQ foi realizado análise descritiva.

Quadro 1 - Número de animais utilizados de acordo com os grupos estudados.

Grupos de estudos	Período do sacrifício após o tratamento		TOTAL
	24hrs	7 dias	
F-L- (Controle)	12	12	24
NIS 1x	12	12	24
NIS 4x	12	12	24
CUR livre	12	12	24
F+L+	CUR-NP (-)	4	4
	CUR-NP (+)	3	6
	CUR livre	12	24
F+L-	CUR-NP (-)	4	4
	CUR-NP (+)	3	6
	CUR livre	12	24
Animais Saudáveis (CN)	-	-	6
Animais perdidos	-	-	11
TOTAL:	66	74	157

*(-): aniônica. (+): catiônica

Fonte: Elaboração própria.

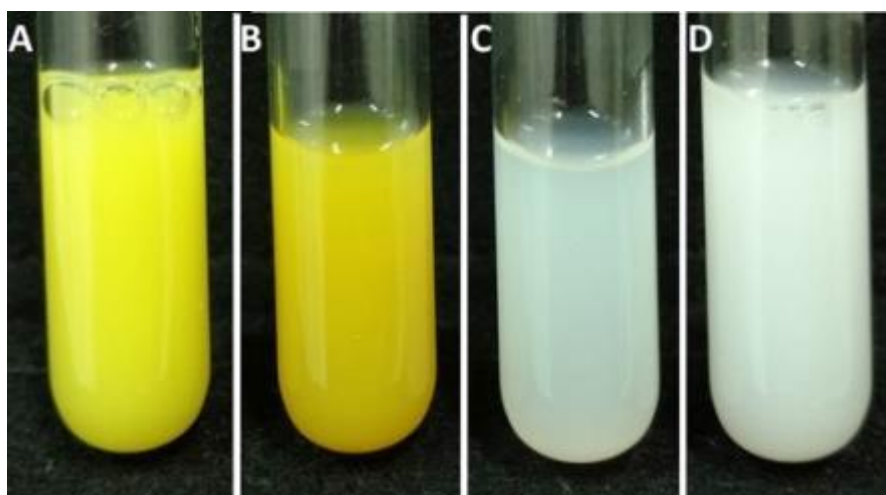
5 RESULTADO

5.1 Curcumina Nanoparticulada

5.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

A síntese da CUR-NP e NP (Figura 6) foi realizada pelo método de nanoprecipitação como descrito previamente, resultando em uma concentração final de 260 μM . Um estudo prévio demonstrou que concentrações maiores de CUR sofriam agregação e, portanto, não eram encapsuladas⁶⁷. As propriedades nanométricas dessas formulações (tamanho, PDI e potencial zeta) foram avaliadas por DLS durante um intervalo de 0 à 29 dias após a síntese, e estão apresentadas na Tabela 1. As formulações demonstraram estabilidade em relação as suas propriedades farmacotécnicas. Foi observado que nos primeiros dias após a síntese, a NP apresentavam menores valores de tamanho e PDI para as formulações de CUR-NP aniônica e catiônica.

Figura 6 - A: CUR-NP aniônica, B: CUR-NP catiônica, C: NP aniônica, D: NP catiônica.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 1 - Valores médios de tamanho, PDI e potencial zeta ($\pm$ desvio padrão) das formulações de NP com e sem CUR determinados em DLS (n=6). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2017.

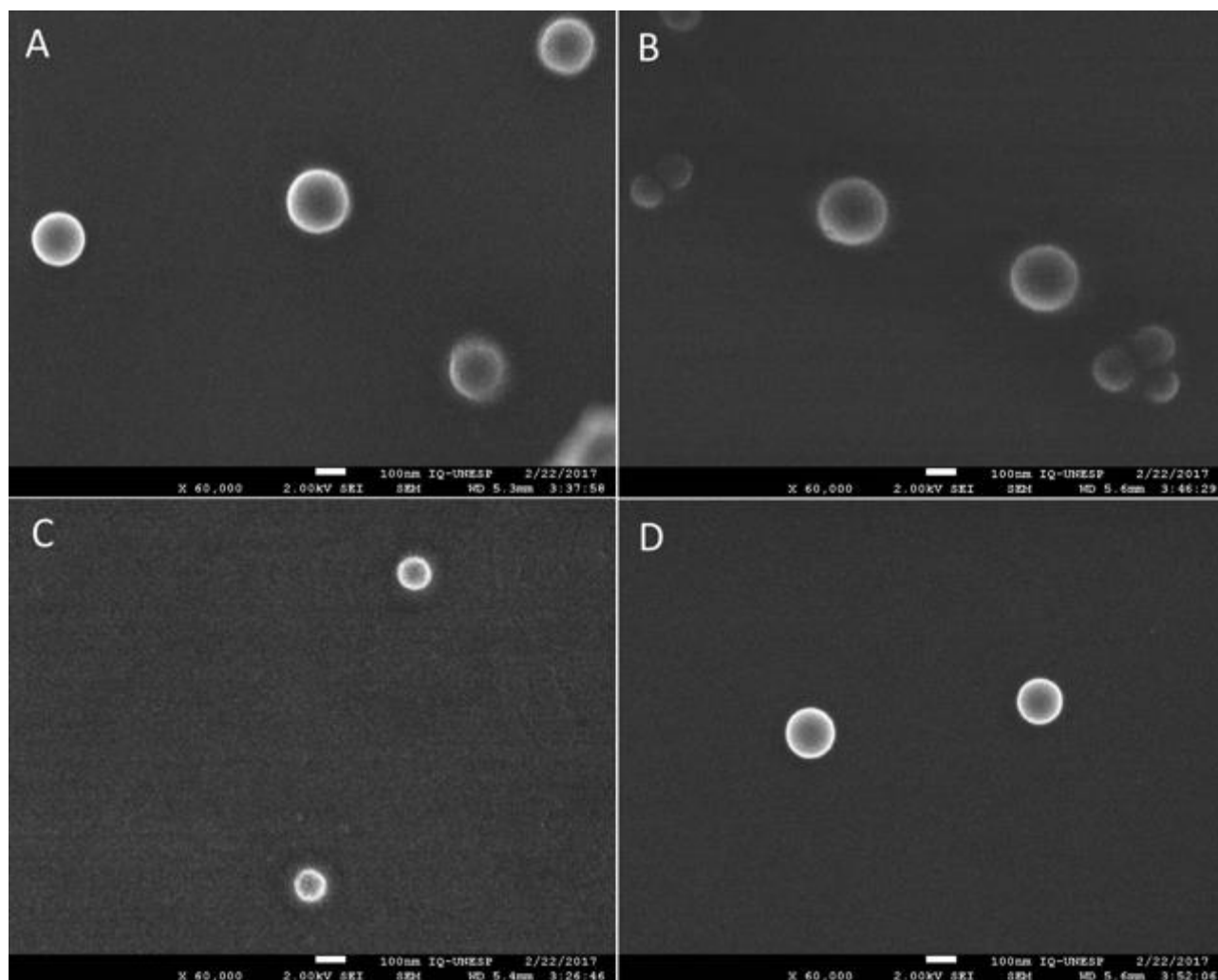
	Tamanho		PDI		Potencial zeta	
CUR-NP aniônica	225,38	($\pm 60,38$)	0,15	($\pm 0,06$)	-30,96	($\pm 12,58$)
CUR-NP catiônica	248,12	($\pm 86,39$)	0,21	($\pm 0,09$)	+35,84	($\pm 7,23$)
NP aniônica	193,33	($\pm 17,95$)	0,15	($\pm 0,05$)	-32,93	($\pm 11,86$)
NP catiônica	186,65	($\pm 14,97$)	0,14	($\pm 0,04$)	+33,45	($\pm 2,69$)

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.1.2 Análise da morfologia das nanopartículas

As imagens realizadas em MEV-FEG mostraram nanopartículas esféricas com tamanhos de 137,6 a 183,93 nm de CUR-NP aniônica e catiônica, respectivamente. As imagens das formulações no MEV-FEG foram analisadas após 9 dias da síntese (Figura 7).

Figura 7 - MEV-FEG das formulações de NP com e sem CUR: A: CUR-NP aniônica, B: CUR-NP catiônica, C: NP aniônica sem CUR, D: NP catiônica sem CUR (magnificação de 60.000x).



Fonte: Elaboração própria.

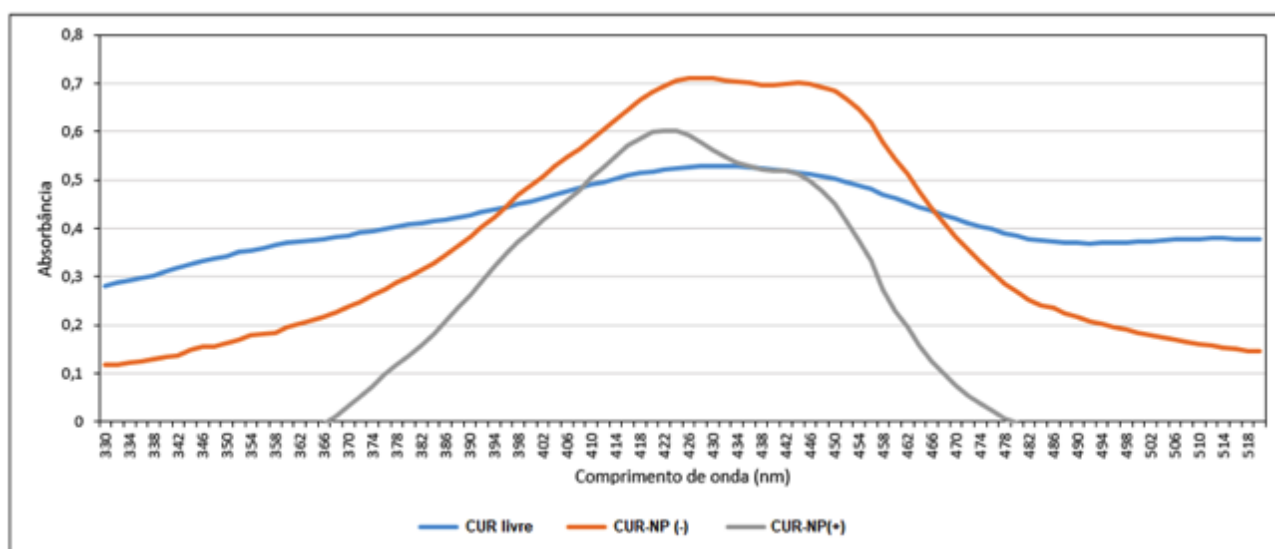
5.1.3 Eficiência de encapsulamento (EE)

Após serem determinadas as absorvâncias das formulações de CUR-NP aniônica e catiônica antes e após a centrifugação, foram observados valores de EE de 60,84% e 73,81% para as formulações de CUR-NP aniônica e catiônica, respectivamente.

5.1.4 Espectro de absorção e estudo de fotoestabilidade dos FSs

Na análise do espectro de absorção UV-visível da CUR livre, CUR-NP aniônica e catiônica, observou-se que o encapsulamento da CUR em NP resultou num espectro de absorbância semelhante à CUR livre, com sinais mais elevados de absorbância na faixa azul do espectro UV-visível. Os comprimentos de onda que apresentaram máxima absorbância para CUR livre, CUR-NP aniônica e CUR-NP catiônica foram de 430 nm, 426 nm e 424 nm, respectivamente. Assim como os valores de comprimento de onda foram próximos, a intensidade de absorbância das formulações e da CUR livre foi também semelhante, com os valores 0,53; 0,712; 0,602 obtidos para CUR livre, CUR-NP aniônica e catiônica, respectivamente (Figura 8).

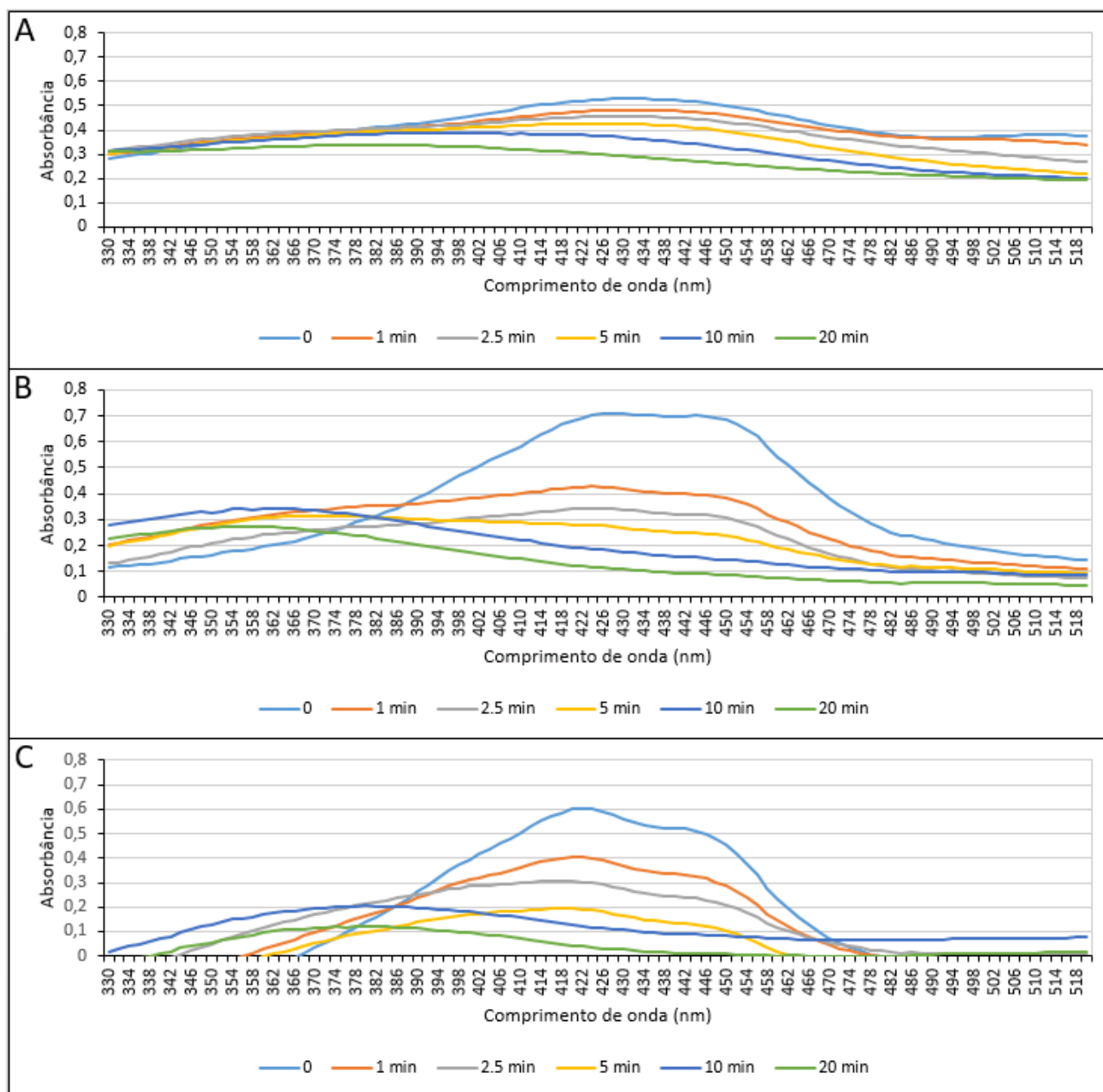
Figura 8 - Espectro de absorção das formulações: CUR livre, CUR-NP (-) aniônica, CUR-NP (+) catiônica.



Fonte: Elaboração própria.

No estudo de fotodegradação, foi verificado redução do sinal máximo de absorbância das formulações de maneira proporcional à dose de irradiação. A CUR livre apresentou uma degradação de 44,7% após uma iluminação de 43,2 J/cm² correspondente a 20 minutos (Figura 9A). Para CUR-NP aniônica, a degradação foi de 84% após 20 minutos de iluminação (Figura 9B). Na Figura 9C observa-se que a fotodegradação da CUR-NP catiônica foi maior entre os FS, equivalente a 94% em 20 minutos de iluminação (43,2 J/cm²).

Figura 9 - Fotodegradação dos FS após diferentes períodos de iluminação com luz LED azul. (A) CUR livre; (B) CUR-NP aniônica; (C) CUR-NP Catiônica.

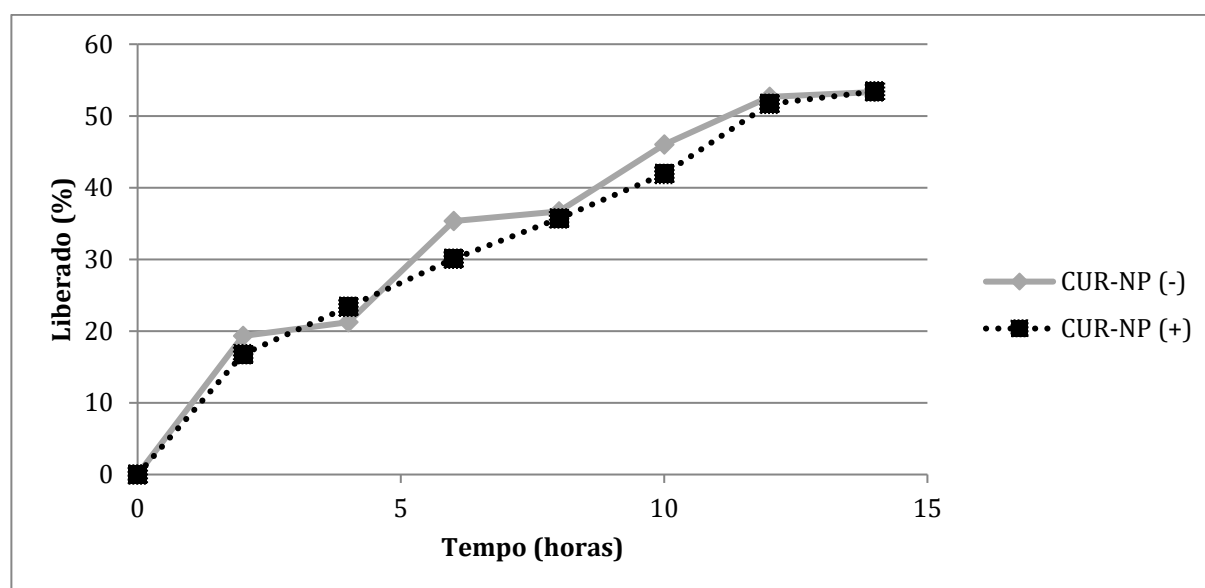


Fonte: Elaboração própria.

5.1.5 Liberação de CUR das NP

A liberação da CUR das NPs foi lenta e progressiva, tendo em vista que após um período de 12 horas a liberação de CUR foi de 52,6% e 51,6% de CUR das NP aniônica e catiônica, respectivamente, como mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Liberação de CUR das NP aniônica e catiônica (em porcentagem).



Fonte: Elaboração própria.

5.2 Modelo Murino com Candidose Oral

5.2.1 Avaliação dos efeitos da aPDT em um modelo murino de candidose bucal

Foram utilizados 140 animais (Quadro 1), divididos entre os grupos: controle (não tratado), F+L- (CUR livre, CUR-NP aniônica e CUR-NP catiônica), NIS 1x, NIS 4x, F+L+ (aPDT com CUR livre 260μM, CUR-NP aniônica e CUR-NP catiônica). Além desses animais, 11 animais iniciaram os experimentos, porém morreram antes dos dias de eutanásia e por isso foram excluídos da pesquisa, porém, eles foram substituídos em seus respectivos grupos. Foi possível observar a presença de placas brancas discretas na região posterior da língua de alguns animais dos grupos controle e F+L- com CUR livre, enquanto que os animais submetidos aos tratamentos (aPDT, NIS 4x e NIS 1x, 24 h e 7 dias após o tratamento) não apresentam lesões de candidose na superfície lingual ao final dos tratamentos (Figura 11). Entretanto, nem todos os animais dos grupos controle e CUR livre apresentaram lesão em seu dorso lingual, inviabilizando a análise macroscópica de regressão das lesões após os tratamentos. Os animais inoculados com *C. albicans* apresentaram

recuperação média $\pm$ desvio-padrão do micro-organismo de $5,02 \pm 0,21 \log_{10}(\text{UFC/mL})$.

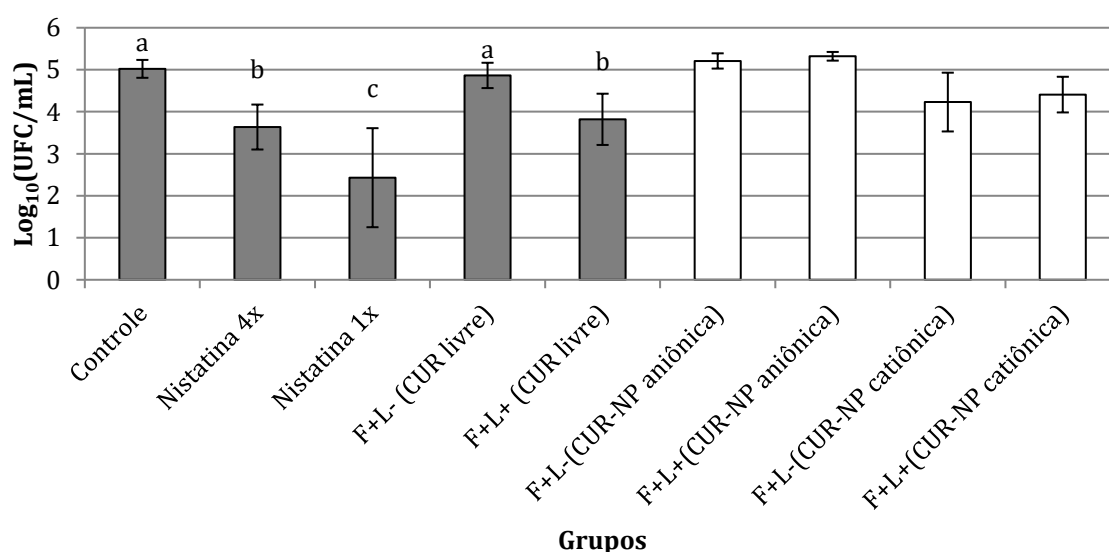
Figura 11 - Região dorsal da língua dos animais dos diferentes grupos 24 horas ou 7 dias após o tratamento. As setas indicam presença de lesão branca de candidose.



Fonte: Elaboração própria.

Os grupos de animais tratados com as formulações CUR-NP aniônica apresentaram valores médios próximos ao grupo controle não tratado, tanto para os grupos tratados com e sem luz, sugestivo de ausência do efeito antifúngico. Já os animais que foram tratados com as formulações de NP catiônicas com ou sem CUR apresentaram redução na viabilidade dos micro-organismos tanto no grupo com luz (F+L+) quanto no grupo sem luz (F+L-). Por essa razão, somente 1 experimento foi realizado com esses grupos, com 6 animais para cada grupo com CUR-NP catiônica (F+L+ e F+L-) e 4 animais para cada grupo com CUR-NP aniônica (F+L+ e F+L-). Nos demais grupos, equivalentes aos animais eutanasiados em 24 horas e 7 dias após os tratamentos (n=24), os valores de médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de *C. albicans* coletado no último dia de tratamento foram analisados por ANOVA a um fator com correção de Welch (APÊNDICE A) e pós-teste de Games-Howell (dados normais e heterocedásticos), com $\alpha=0,05$. Foi observada uma redução média de 1,19 $\log_{10}$ para o grupo aPDT com CUR livre 260 μM ($p<0,001$), 1,39 $\log_{10}$ para o grupo NIS 4x ($p<0,001$) e uma maior redução de 2,59 $\log_{10}$ para o grupo NIS 1x ($p<0,001$), quando comparados com o grupo controle (C-L-). Já o grupo tratado somente com CUR livre 260 μM apresentou valores próximos ao grupo controle, sem diferença significativa ($p=0,966$) (Figura 12).

Figura 12 - Valores médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ de *C. albicans* recuperados no último dia de tratamento do dorso lingual dos animais. Letras semelhantes representam semelhança estatística entre os grupos. Barras cinzas: n=24. Barras de erro: desvio-padrão. Barras brancas: CUR-NP- aniônica e CUR-NP+ catiônica na ausência (F+L-) e presença (F+L+, aPDT) de luz. Letras diferentes denotam diferença estatística ($p<0,001$).

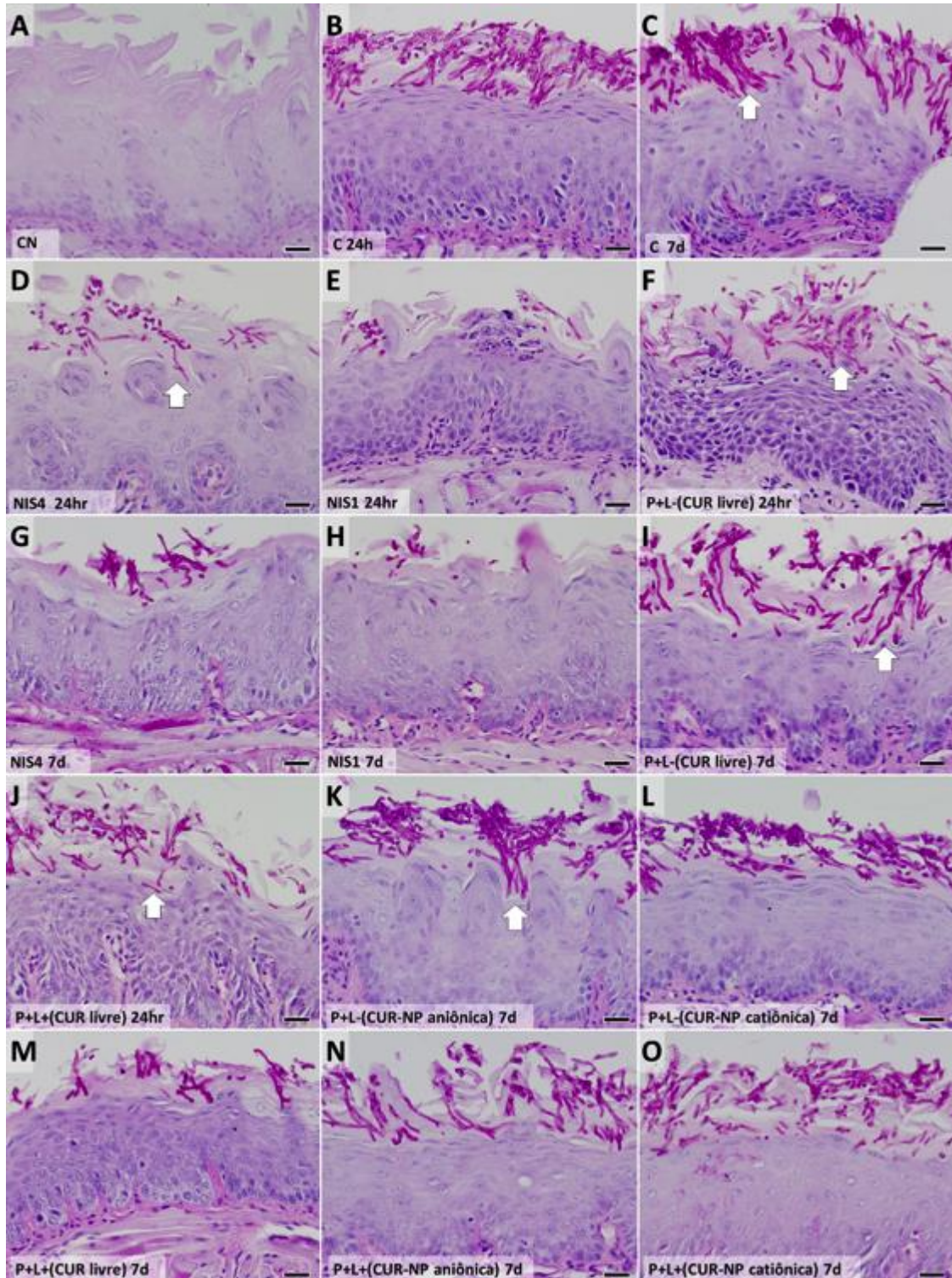


Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Análise histológica da língua dos animais

Na análise histológica (PAS, Figura 13), em todos os animais infectados o epitélio mostrou alteração das papilas filiformes na região queratina, presença da forma filamentosa de *C. albicans* no epitélio queratinizado e com invasão no epitélio subjacente, além de poucas células inflamatórias na lâmina própria da mucosa lingual dos animais em comparação com os animais saudáveis (grupo CN). Os animais tratados com aPDT (F+L+) com CUR livre e nistatina quatro vezes por dia (NIS4x) também mostraram essas alterações histológicas, porém, com uma camada menos espessa de células fúngicas em comparação com os animais dos grupos controle (F-L-), P+L- (CUR livre, Grupos CUR-NP aniônicos e catiônicos) e F+L+ com CUR-NP aniônicos e catiônicos, os quais apresentaram características histológicas semelhantes, para ambos os períodos avaliados (24 horas e 7 dias após o tratamento). O grupo de animais tratados com nistatina uma vez por dia (NIS1x, sacrificados tanto em 24 horas e 7 dias) demonstraram a menor quantidade de células fúngicas na camada epitelial. Subjacente à camada de queratina, o epitélio apresentou morfologia desestruturada nos animais infectados, com presença de poucas células inflamatórias no conjuntivo subjacente (inflamação discreta).

Figura13 - Avaliação histológica (PAS) dos tecidos linguais dos animais saudável, infectados e tratados 24 horas e 7 dias após o tratamento. **A**: Controle negativo (CN). **B, C**: Controle (C) 24 horas/7dias após o tratamento. **D, G**: NIS4 24 horas/7dias após o tratamento. **E, H**: NIS1 24 horas/7dias após o tratamento. **F,I**: P+L- CUR livre 24 horas/7dias após o tratamento. **J,M**: P+L+ CUR livre 24 horas/7dias após o tratamento. **K**: P+L- CUR-NP aniônico 7dias após o tratamento. **N**: P+L+ CUR-NP aniônico 7 dias após o tratamento. **L**: P+L- CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. **O**: P+L+ CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. Flecha branca: Invasão de *C. albicans* na camada epitelial subjacente. Magnificação: 40x. barra: 20 μ M.

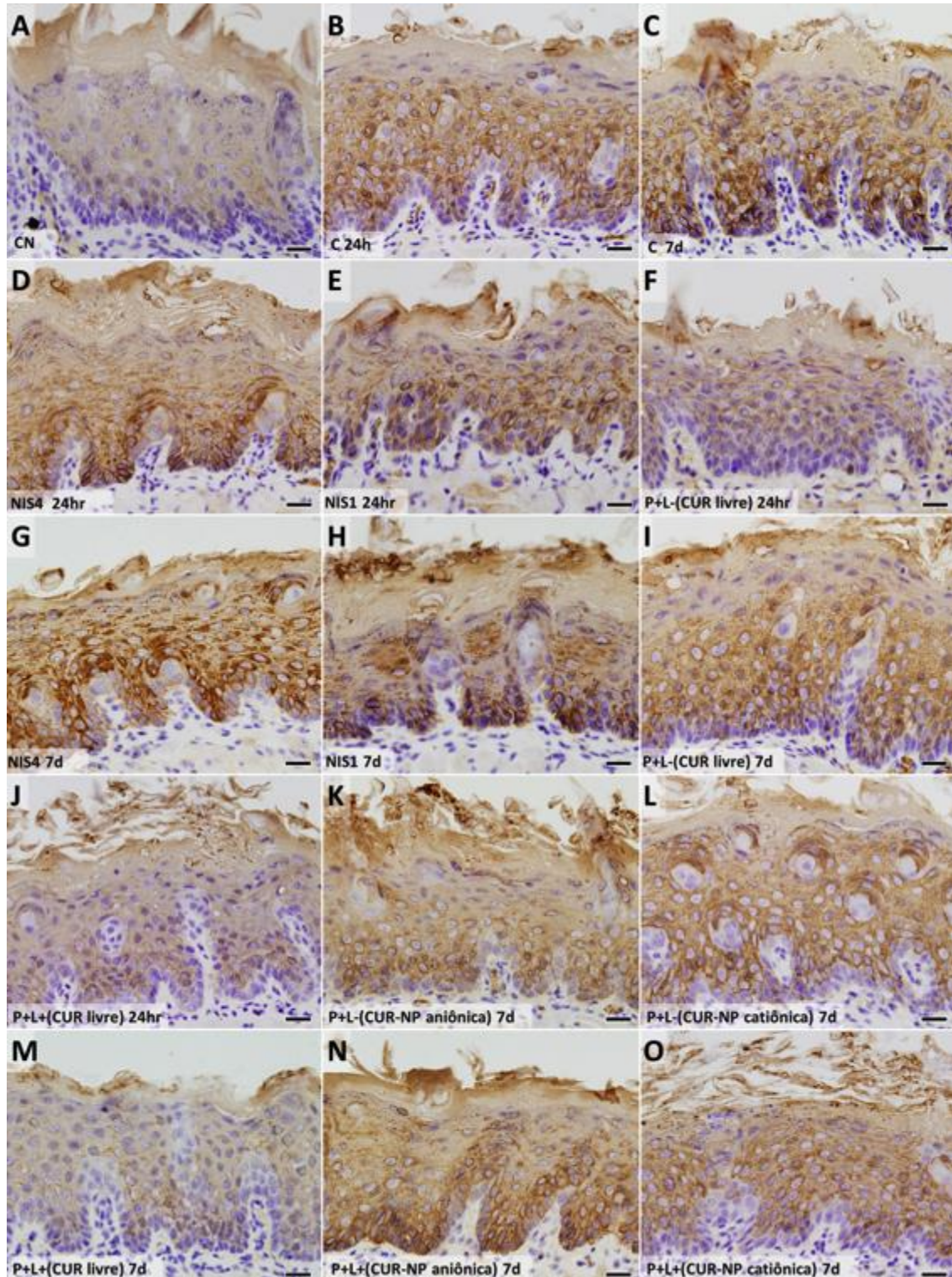


Fonte: Elaboração própria.

5.2.3 Avaliação de CKs 13 e 14 por ensaio imunohistoquímico

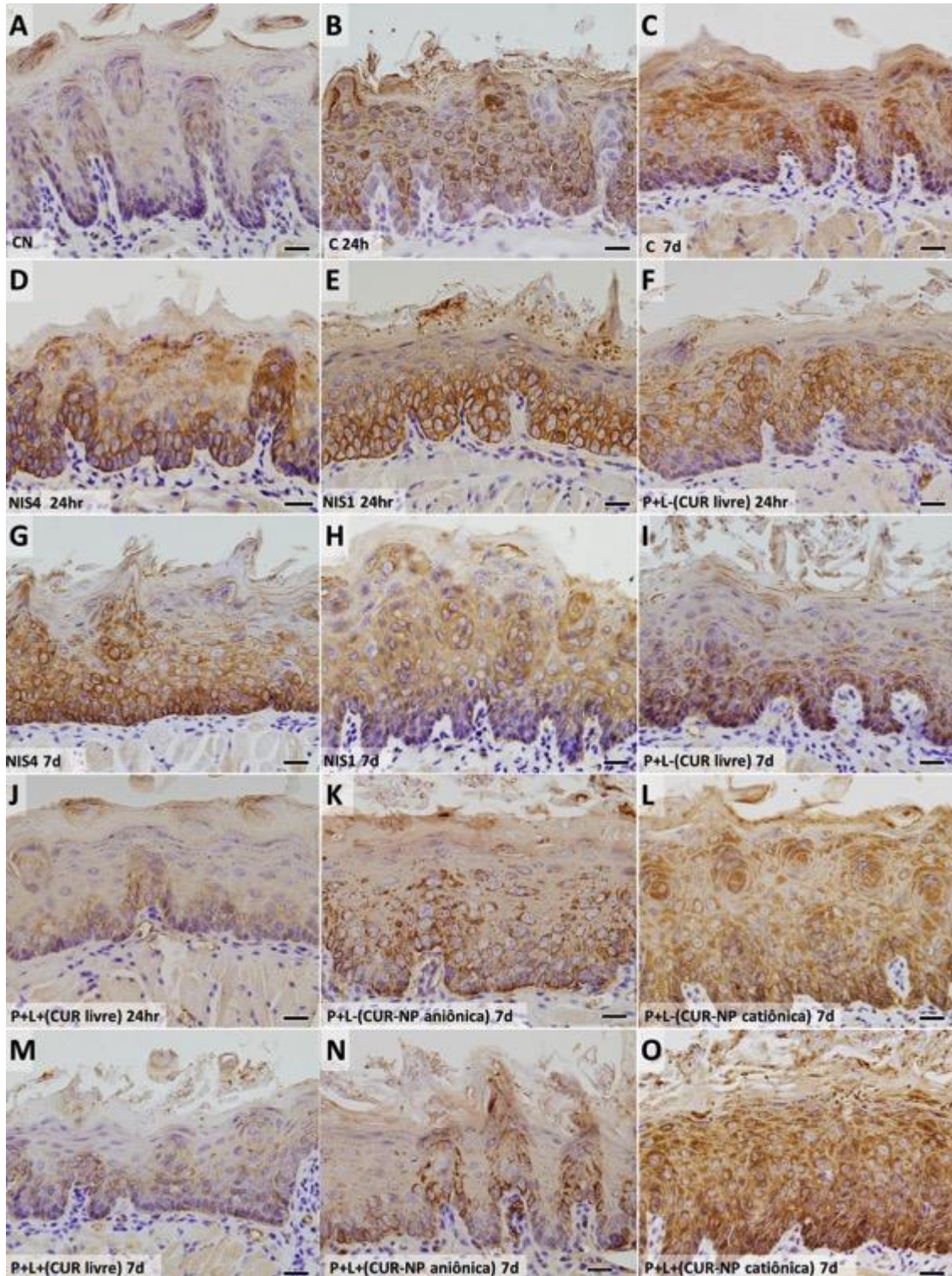
A avaliação das CK13 (Figura 14) e CK14 (Figura 15) por IHQ demonstrou diferentes níveis de expressão de acordo com os grupos de tratamentos e períodos de avaliação. Em animais saudáveis (grupo CN) foi observado leve marcação da expressão de CK13 e CK14. Por outro lado, os animais infectados não tratados (grupo controle, F-L-) apresentaram expressão mais intensa para ambas as CKs em 24 horas e 7 dias após o tratamento. Os animais tratados com CUR livre com ausência luz (F+L-) mostraram expressão de ambas CKs semelhante ao controle não tratado no período de 24 h após o tratamento, porém uma expressão menos intensa foi observada 7 dias após o tratamento. Os animais do grupo F+L+ (aPDT) com CUR livre mostraram expressão menos intensa de CK13 e CK14 em ambos os períodos (24 horas e 7 dias), as quais foram similares aos animais saudáveis (CN). Uma marcação intensa de CK13 e CK14 foi observada em camundongos do grupo NIS1x, NIS4x e CUR-NP catiônica para ambos os períodos. A CUR-NP aniônica, para ambos os períodos, apresentou uma expressão mais intensa para CK 13 e uma expressão mais suave para CK 14.

Figura 14 - Imagens do ensaio IHQ (CK13) dos tecidos linguais dos animais saudáveis, infectados e tratados 24 horas e 7 dias após o tratamento. **A**: Controle negativo, CN. **B**, **C**: Controle, C 24 horas/7 dias após o tratamento. **D**, **G**: NIS4 24 horas/7 dias após o tratamento. **E**, **H**: NIS1 24 horas/7 dias após o tratamento. **F**, **I**: P+L- CUR livre 24 horas/7 dias após o tratamento. **J**, **M**: P+L+ CUR livre 24 horas/7 dias após o tratamento. **K**: P+L- CUR-NP aniônico 7 dias após o tratamento. **N**: P+L+ CUR-NP aniônico 7 dias após o tratamento. **L**: P+L- CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. **O**: P+L+ CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. Magnificação: 40x. barra: 20 μ M.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Imagens do ensaio IHQ (CK14) dos tecidos linguais dos animais saudáveis, infectados e tratados 24 horas e 7 dias após o tratamento. **A**: Controle negativo (CN). **B, C**: Controle (C) 24 horas/7 dias após o tratamento. **D, G**: NIS4 24 horas/7 dias após o tratamento. **E, H**: NIS1 24 horas/7 dias após o tratamento. **F, I**: P+L- CUR livre 24 horas/7 dias após o tratamento. **J, M**: P+L+ CUR livre 24 horas/7 dias após o tratamento. **K**: P+L- CUR-NP aniônico 7 dias após o tratamento. **N**: P+L+ CUR-NP aniônico 7 dias após o tratamento. **L**: P+L- CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. **O**: P+L+ CUR-NP catiônico 7 dias após o tratamento. Magnificação: 40x. barra: 20 μ M.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A CUR-NP foi sintetizada pelo método de nanoprecipitação⁴⁶ utilizando PLA e DEX mostrando propriedades semelhantes às descritas anteriormente⁶⁷, evidenciando que o processo de síntese utilizado para obter CUR-NP foi reproduzível. Embora as formulações sintetizadas fossem estáveis em solução, suas características físico-químicas (tamanho, PDI e potencial zeta) mudaram ao longo do tempo. Portanto, todos os experimentos foram realizados imediatamente após a síntese. Mesmo com 29 dias após a síntese, os valores encontrados em DLS foram comparáveis a outras investigações^{14,29,42,71}, que empregaram diferentes polímeros e métodos para sintetizar CUR-NP. No presente estudo, o tamanho das CUR-NP também foi avaliado pelo MEV-FEG, que demonstrou um tamanho menor encontrado por DLS, devido à contração das NP durante o procedimento de secagem necessário para MEV-FEG²⁸.

O processo de encapsulamento não alterou os espectros de absorção da CUR neste estudo, uma vez que os valores máximos de absorbância obtidos a partir de CUR livre, CUR-NP aniônica e catiônica foram observados em comprimentos de onda azuis, semelhantes aos relatados em estudos anteriores em que a CUR mostrou absorbância entre 400-470nm^{5,26}. Além disso, o teste de fotoestabilidade demonstrou que a todos os FS apresentaram fotodegradação superior a 44,7% após uma iluminação de 20 minutos com LED azul (43,2 J/cm²). Este resultado está de acordo com uma investigação realizado anteriormente⁶⁷, em que a CUR livre apresentou menor fotodegradação em comparação com CUR-NP. Outros estudos encontraram valores de degradação de 46% e 86% após uma iluminação de 9.4 J/cm²³⁴, e 70% após uma iluminação de 0,4 J/cm²²⁴.

No presente estudo, a porcentagem de EE foi de 60,84% para CUR-NP aniônica e 73,81% para CUR-NP catiônica. Esses valores estão de acordo com outras investigações que verificaram EE de 46,9% para 97%^{14,33,42}. Durante o teste liberação, as CUR-NP's demonstraram uma liberação lenta e progressiva ao longo do tempo. Após 12 horas, aproximadamente 52% da CUR foi liberada do NP. Um estudo anterior verificou que foram necessárias 48 horas para liberar 96% de CUR de NP⁶⁷, e outros estudos também observaram uma liberação progressiva da CUR de 20% para 92,8% após 6 até 8 dias^{14,42,45}.

No presente estudo, o método de tratamento por aPDT com CUR livre aplicado no dorso da língua dos camundongos com candidíase oral resultou em uma redução de 1,19 log₁₀ na viabilidade de *C. albicans*. Entretanto, um estudo anterior demonstrou que a eficácia fotodinâmica antifúngica da CUR promoveu uma redução de 4 log₁₀ da recuperação de *C. albicans* da língua de camundongos com candidíase oral induzida em uma única aplicação tópica de aPDT²³. Em outra

investigação, cinco aplicações aPDT com PDZ reduziram a viabilidade fúngica em $3 \log_{10}$ e não houve perda de animais durante todo o experimento¹⁰. Por outro lado, no presente estudo, 11 animais morreram durante os experimentos, o que foi um resultado inesperado. Essas mortes podem ser atribuídas ao tempo prolongado de infecção e à aplicação de aPDT consecutiva, que requer anestésias diárias nos animais. Um longo período de candidíase oral pode levar os animais a uma infecção sistêmica devido à condição de imunossupressão dos camundongos e à capacidade da *C. albicans* invadir os tecidos, o que foi observado na análise histológica. Além disso, após a anestesia, poderia ser necessário um período de mais 24 horas para recuperação dos animais antes de outra aplicação da aPDT. Embora o estudo anterior não tenha relatado morte, nem perda de peso e sem alteração do comportamento dos camundongos, a possibilidade de infecção sistêmica e morte devem ser levadas em consideração quando a candidíase oral é induzida. As mortes observadas no presente estudo sugerem que a saúde sistêmica prejudicada dos camundongos também reduziria a eficácia dos tratamentos realizados. Portanto, a saúde prejudicada dos camundongos também pode explicar a menor eficácia antifúngica da aPDT neste estudo, uma vez que um sistema imunológico competente também é necessário para melhorar a defesa do hospedeiro contra *C. albicans*.

O tratamento com nistatina quatro vezes ao dia sem anestesia geral foi realizado para simular uma terapia antifúngica realizada em pacientes, e mostrou eficácia antifúngica semelhante à aPDT (F+L+ com CUR livre). Um ensaio clínico também demonstrou que a aplicação tópica de nistatina apresentou resultados semelhantes ao aPDT para candidíase oral⁵³. Surpreendentemente, a nistatina uma vez ao dia em animais anestesiados foi o tratamento mais eficaz neste estudo. Essa maior redução da viabilidade fúngica demonstrada pela nistatina uma vez ao dia pode ser justificada pela anestesia, que permite um período de ação mais longo do agente antifúngico. A nistatina aplicada em camundongos não anestesiados é removida da boca quando os animais se alimentam, ingerem água, se lambem, etc. Carmello et al.¹⁰ também observaram uma alta redução de *C. albicans* ($3,2 \log_{10}$) após aplicação da nistatina uma vez por dia em camundongos anestesiados. Embora o aPDT tenha sido realizado em animais anestesiados, sua ação antimicrobiana ocorre apenas quando o FS é ativado pela luz, uma vez que as espécies de oxigênio reativo produzidas têm uma vida útil muito curta (microssegundos)⁶⁴. Portanto, como a redução na viabilidade de *C. albicans* observada com aPDT uma vez por dia foi semelhante à nistatina quatro vezes ao dia, o efeito antifúngico da aPDT pode ser considerado relevante.

Em relação à avaliação das CUR-NPs, nenhum efeito antifúngico foi verificado para a formulação aniônica na ausência ou presença de luz. Isso poderia ser explicado pela carga negativa da formulação que promove a repulsão contra a carga negativa da matriz de biofilme³ e a parede

celular de *C. albicans*⁵⁹, o que impede a interação da formulação com os micro-organismos do biofilme. Outra justificativa para a ausência do efeito antifúngico da CUR-NP aniônica é a liberação lenta da CUR das NP. O protocolo da aPDT estabelecida no presente estudo para o tempo de pré-irradiação do FS na língua dos animais correspondeu a 20 minutos. Durante o teste de liberação de CUR, menos de 10% de CUR foi liberada em 20 minutos das formulações de NP, o que poderia ter reduzido a eficácia antimicrobiana da aPDT. Krauz et al. sintetizaram CUR-NP de quitosana e polietilenoglicol aplicando topicamente esta formulação sobre feridas de queimadura em camundongos infectadas com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM). Após 7 dias de tratamento, observou-se uma redução significativa nas contagens bacterianas de SARM (mais de 1 log)⁴⁵. No presente estudo, a aplicação de CUR-NP por 5 dias consecutivos resultaria na liberação total de CUR das NPs. No entanto, a aplicação tópica na língua não mantém a CUR-NP na mucosa lingual, devido à ação da saliva, à alimentação dos animais, etc.

Para obter CUR-NP catiônica, o CTAB foi usado para alterar a carga das NP. Esta formulação reduziu os valores de UFC/mL de *C. albicans* das línguas dos camundongos mesmo na ausência de luz. Portanto, não foi observado um efeito fotodinâmico, semelhante à CUR-NP aniônica. Este resultado é semelhante a um estudo anterior in vitro que verificou a redução das culturas planctônicas e biofilmes de SARM, *Streptococcus mutans* e *C. albicans* tratados com esta formulação catiônica exposta ou não à luz⁶⁷. No entanto, o efeito antimicrobiano da CUR-NP catiônica pode ser justificado pela presença de CTAB, que por si só já apresenta efeito antimicrobiano⁶⁰.

A análise histológica demonstrou que a quantidade de *C. albicans* na camada de queratina da língua corrobora com os resultados de UFC/mL. Portanto, poucas células filamentosas foram observadas para grupos tratados com nistatina e aPDT com CUR livre. A reação inflamatória foi observada em todos os camundongos infectados com *C. albicans*, sugerindo que os tratamentos não exacerbaram a resposta inflamatória dos tecidos. Esses resultados histológicos foram semelhantes para ambos os períodos de avaliação (24 horas e 7 dias após os tratamentos), corroborando com um estudo prévio realizado por Carmello et al. No entanto, esses autores não observaram invasão de fungos no epitélio de animais tratados com nistatina⁹, enquanto que no presente estudo a invasão de fungos também foi verificada em animais tratados com nistatina.

Outros estudos in vivo avaliaram as características histopatológicas da cicatrização de feridas epidérmicas tratadas com CUR-NP. Quando a cura da ferida por queimadura de camundongos foi avaliada, a CUR-NP reduziu o infiltrado inflamatório, melhorou a deposição de colágeno e a neovascularização dessas lesões⁴⁵. A CUR-NP de poli (ácido láctico-co-glicólico)

também melhorou a cicatrização da ferida excisional dos animais, que apresentou melhor re-epitelização e aumentou a deposição de tecido conjuntivo e colágeno¹⁴. Um composto de hidrogel com CUR encapsulado em micelas também melhorou a cicatrização de feridas de ratos, que mostrou aumento da re-epitelização, do tecido de granulação e de deposição de fibroblasto e colágeno³⁰. A CUR em gel de *Pluronic* também acelerou a cicatrização de animais diabéticos⁴⁰.

Uma vez que este estudo avaliou uma infecção superficial de uma mucosa oral ao invés de um modelo de cicatrização de feridas epidérmicas, o efeito da aPDT mediada por CUR-NP no tecido da língua dos animais foi avaliado. No presente estudo, a infecção por fungos aumentou a expressão de ambas as CK avaliadas, o que pode ser atribuído à desordem epitelial e à resposta celular devido à invasão de fungos. Até o presente momento, não há na literatura um estudo que observou aumento na expressão de CK 13 e 14 devido à candidíase oral como no presente estudo. Outras investigações relataram alteração da expressão de CK devido a lesões orais, como o líquen plano^{39,58} e a queilite actínica²², mas nenhuma expressão de CK associada a biofilme microbiano. Além disso, este estudo mostrou que os tratamentos apenas com FS sem luz e nistatina também aumentaram a expressão de CK 13 e 14, semelhante ao grupo de controle não tratado, uma vez que o tratamento com FS sem luz não reduziu a quantidade fúngica. No entanto, embora a nistatina tenha reduzido a viabilidade fúngica dos camundongos, a expressão de CK 13 e 14 foi semelhante ao grupo controle não tratado, sugerindo que a nistatina não conseguiu melhorar a reorganização do citoesqueleto do epitélio mesmo após 7 dias, ao final do tratamento. Surpreendentemente, a aPDT com CUR livre resultou na expressão de CK semelhante a animais não infectados (controle negativo). Este resultado sugere que, ao mesmo tempo em que há redução da viabilidade fúngica, a aPDT também contribuiu para uma normal expressão de CK 13 e 14 das células epiteliais. Este foi um resultado bastante positivo apesar de inesperado, uma vez que a aPDT não eliminou completamente a quantidade fúngica da língua dos animais, portanto, esperar-se-ia que a expressão de CK deveria ser mais intensa. Por outro lado, o tratamento com CUR-NP (com e sem luz) resultou na expressão de CK 13 e 14 semelhantes aos animais infectados. Para a CUR-NP aniônica, esse resultado pode ser explicado pela ausência de atividade antimicrobiana. Embora a CUR-NP catiônica tenha reduzido a viabilidade fúngica, a expressão aumentada de ambas as CK pode ser justificada pela ação de CTAB em sua composição.

Estudos adicionais devem ser desenvolvidos para melhorar a liberação de CUR do NP e seu efeito antimicrobiano, e para entender melhor a resposta do tecido infectado à aPDT.

7 CONCLUSÃO

Sendo assim, podemos concluir que:

1. O encapsulamento da CUR em NP melhorou a solubilidade em água e a estabilidade da CUR;
2. Aplicação de nistatina uma vez ao dia sob anestesia geral mostrou o melhor efeito antifúngico in vivo;
3. A aPDT com CUR livre resultou em expressão normal de CK 13 e 14 do epitélio da língua, resultado não observado para os animais tratados com nistatina;
4. CUR livre mostrou um melhor efeito fotodinâmico in vivo do que as CUR-NP aniônica e catiônica.

REFERÊNCIAS*

1. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014; 116(1): 1-7.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922) :455-9
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 55(8): 999-1008.
4. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013;58(2): 200-10.
5. Baltazar LM, Krausz AE, Souza AC, Adler BL, Landriscina A, Musaev T, et al. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120179
6. Borges-Ferro A. *Imunohistoquímica*. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL); 2008. 127p.
7. Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(6): 767-79.
8. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 327-35.
9. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology.* 2007;153(Pt 10): 3211-7.
10. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(7): 1319-28.
11. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG. Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *Candida* to photodynamic treatment. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(5): 1141-8. Erratum in: *Photochem Photobiol.* 2008;84(6):1605.
12. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10): 4288-95.
13. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001;80(3): 903-8.
14. Chereddy KK, Coco R, Memvanga PB, Ucar B, Rieux A, Vandermeulen G, et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J Control Release.* 2013;171(2): 208-15.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

15. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*. 2010; 5(3): 321-32.
16. Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Jr, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol*. 2011;56(11): 1299-305.
17. Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012; 55(1): 56-63.
18. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000; 45(1): 69-72.
19. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
20. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26(6): 377-84.
21. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86(1): 59-69.
22. dos Santos JN, de Sousa SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(4): 237-41.
23. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013;51(3): 243-51.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895-903.
25. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011; 54(2): 123-30.
26. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895-903.
27. Freire F, Costa AC, Pereira CA, Beltrame Junior M, Junqueira JC, Jorge AO. Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(3): 949-55.
28. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 69(1): 1–9

29. Ghosh D, Choudhury ST, Ghosh S, Mandal AK, Sarkar S, Ghosh A, et al. Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chem Biol Interact.* 2012; 195(3): 206-14
30. Gong C, Wu Q, Wang Y, Zhang D, Luo F, Zhao X, et al. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials.* 2013; 34(27): 6377-87.
31. Gonzales FP, Felgenträger A, Bäumler W, Maisch T. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol.* 2013; 8(6): 785-97.
32. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. Pharmazie.* 2010; 65(8): 600-6.
33. Hazzah HA, Farid RM, Nasra MMA, Hazzah WA, El-Massik MA, Abdallah OY. Gelucire-based nanoparticles for Curcumin Targeting to oral mucosa: preparation, characterization, and antimicrobial activity assessment. *J Pharm Sci.* 2015; 104(11): 3913-24.
34. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides XLII. *J Pharm Sci.* 2011; 104(11): 174-85.
35. Hegge AB, Nielsen TT, Larsen KL, Bruzell E, Tønnesen HH. Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy--effect of cyclodextrin type and amount: studies on curcumin and curcuminoides XLV. *J Pharm Sci.* 2012; 101(4): 1524-37.
36. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 982-90.
37. Iwasaki S, Aoyagi H, Yoshizawa H. Localization of keratins 13 and 14 in the lingual mucosa of rats during the morphogenesis of circumvallate papillae. *Acta Histochem.* 2011; 113(4): 395-401.
38. Iwasaki S, Yoshizawa H, Aoyagi H. Immunohistochemical expression of keratins 13 and 14 in the lingual epithelium of rats during the morphogenesis of filiform papillae. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(5): 416-26.
39. Jacques CM, Pereira AL, Maia V, Cuzzi T, Ramos-e-Silva M. Expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus. *J Oral Sci.* 2009; 51(3): 355-65.
40. Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2014; 20(2): 322-30.
41. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 205-18.
42. Khalil NM, do Nascimento TCF, Casa DM, Dalmolin LF, de Mattos AC, Hoss I, et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloid Surf B.* 2013; 101: 353-60.

43. Kong EF, Kucharíková S, Van Dijck P, Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Clinical implications of oral candidiasis: host tissue damage and disseminated bacterial disease. *Infect Immun*. 2015; 83(2): 604-13.
44. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707. Erratum in: *J Dent Res*. 2007; 86(11): 1126.
45. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine*. 2015; 11(1): 195-206
46. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 75(1):1–18
47. Liu J, Chen S, Lv L, Song L, Guo S, Huang S. Recent progress in studying curcumin and its nano-preparations for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2013; 19(11): 1974-93.
48. Mantareva V, Angelov I, Kussovski V, Dimitrov R, Lapok L, Wöhrle D. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur J Med Chem*. 2011; 46(9) : 4430-40.
49. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10(1): 91-102.
50. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(2): 337-9.
51. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(3): 392-401.
52. Mima EG, Pavarina AC, Silva MM, Ribeiro DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(5): 602-8.
53. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(10): E380-8.
54. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014; 35(10): 3365-83.
55. Patuwo C, Young K, Lin M, Pardi V, Murata RM. The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART. *J Calif Dent Assoc*. 2015; 43(2): 87-92
56. Rao RS, Patil S, Ganavi BS. Oral cytokeratins in health and disease. *J Contemp Dent Pract*. 2014; 15(1): 127-36.

57. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva Jde F, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(1): 111-9.
58. Rivarola de Gutierrez E, Innocenti AC, Cippitelli MJ, Salomón S, Vargas-Roig LM. Determination of cytokeratins 1, 13 and 14 in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014; 19(4): e359-65.
59. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(1): 14-29.
60. Salton MR. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *J Gen Microbiol.* 1951; 5(2): 391-404.
61. Samaranayake LP, Macfarlane TW. Oral candidosis. London: Wright; 1990. 265 p.
62. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol.* 1986; 15(2): 61-5.
63. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(2): 213-67.
64. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55(1): 143-66.
65. Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, Yu A, Lou H, Zhai G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine (Lond).* 2012; 7(7): 1085-100.
66. 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.* 2003; 47(5): 321-6.
67. Trigo-Gutierrez JK. Síntese, caracterização e efeitos fotodinâmicos da curcumina encapsulada em nanopartículas poliméricas,[Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.
68. Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials.* 2011; 32(33): 8593-604.
69. Vyas A, Dandawate P, Padhye S, Ahmad A, Sarkar F. Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(11): 2047-69.
70. Watanabe S, Osumi M, Ohnishi T, Ichikawa E, Takahashi H. Changes in cytokeratin expression in epidermal keratinocytes during wound healing. *Histochem Cell Biol.* 1995;103(6): 425-33.
71. Yallapu MM, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interface Sci.* 2010; 351(1): 19-29.
72. Zou W, Liu C, Chen Z, Zhang N. Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA. *Nanoscale Res Lett.* 2009; 4 (9): 982–92.

ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA



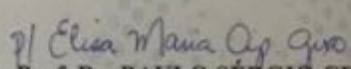
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado ***"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS FOTODINÂMICOS DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM MODELO MURINO DE CANDIDOSE BUCAL"***, protocolo nº 19/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Ewerton Garcia de Oliveira Mima** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 08/12/2015.

Vigência do Projeto	Outubro/2017
Espécie/linhagem	Camundongo – Swiss mice
Nº de animais	186
Peso/Idade	35-40g – 6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
 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 - Fax: (16) 3301-6439 / fax: (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@fou.unesp.br - home page: <http://www.fou.unesp.br>

APÊNDICE A – OUTPUT SPSS

TABELA A1 - ANOVA um fator com correção de Welch de UFC/mL nas diferentes condições experimentais

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	101,341	4	25,335	57,984	,000
Nos grupos	50,247	115	,437		
Total	151,588	119			

	Estatística	Df1	Df2	Sig.
Welch	70,949	4	54,239	0

Fonte: Elaboração própria.

TABELA A2 - Pós teste de Games-Howell

		Intervalo de Confiança 95%				
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Limite inferior	Limite superior
Controle	Nistatina4X	1,41*	0,11	0,000	1,07	1,75
	Nistatina1X	2,45*	0,24	0,000	1,73	3,17
	Curcumina260	0,04	0,07	0,966	-0,16	0,26
	PDT260	1,14*	0,13	0,000	0,76	1,53
Nistatina4X	Controle	-1,41*	0,11	0,000	-1,75	-1,07
	Nistatina1X	1,03*	0,26	0,004	0,27	1,80
	Curcumina260	-1,36*	0,12	0,000	-1,72	-1,00
	PDT260	-0,26	0,16	0,488	-0,74	0,20
Nistatina1X	Controle	-2,45*	0,24	0,000	-3,17	-1,73
	Nistatina4X	-1,03*	0,26	0,004	-1,80	-0,27
	Curcumina260	-2,40*	0,24	0,000	-3,13	-1,68
	PDT260	-1,30*	0,27	0,000	-2,08	-0,52
Curcumina260	Controle	-,048	0,07	0,966	-0,26	0,16
	Nistatina4X	1,36*	0,12	0,000	1,00	1,72
	Nistatina1X	2,40*	0,24	0,000	1,68	3,13
	PDT260	1,09*	0,13	0,000	0,69	1,49
PDT260	Controle	-1,14*	0,13	0,000	-1,53	-0,76
	Nistatina4X	0,26	0,16	0,488	-0,20	0,74
	Nistatina1X	1,30*	0,27	0,000	0,52	2,08
	Curcumina260	-1,09*	0,13	0,000	-1,49	-0,69

*. A diferença média é significativa no nível 0,05.

Fonte: Elaboração própria.

Autorizo a reprodução total deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 31 de julho de 2017.

VINICIUS TATSUYUJI SAKIMA